

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATEUS DONIZETTI OLIVEIRA DE ASSIS

**AÇÃO DE CUMARINAS SINTÉTICAS SOBRE CRESCIMENTO INICIAL
E CARIOLOGIA DE PLANTAS SUPERIORES**

**ALFENAS/MG
2019**

MATEUS DONIZETTI OLIVEIRA DE ASSIS

**AÇÃO DE CUMARINAS SINTÉTICAS SOBRE CRESCIMENTO INICIAL
E CARIOLOGIA DE PLANTAS SUPERIORES**

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

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Coorientadora: Dra. Luciene de O. R. Trindade

Colaboradores: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Kamilla Pacheco Govêa

Rafaella Sueko Tomita Pereira

Pamela Ingridi Alves

**ALFENAS/MG
2019**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Assis, Mateus Donizeti oliveira de .

Ação de cumarinas sintéticas sobre crescimento inicial e cariologia de plantas superiores / Mateus Donizeti oliveira de Assis. - Alfenas, MG, 2019.

44 f. : il. -

Orientador(a): Sandro Barbosa.

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

Bibliografia.

1. Formileugenol. 2. Aleloquímico. 3. Índice alelopático. 4. Lacutca sativa. 5. Bidens pilosa. I. Barbosa, Sandro, orient. II. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-001
Fone: (35) 3697-4729 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



MATEUS DONIZETTI OLIVEIRA DE ASSIS

“Mecanismos de ação de cumarinas sintéticas em bioensaios vegetais”

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

Aprovado em: 31 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: _____

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

Assinatura: _____

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

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a minha amada esposa, aos meus pais, a minha irmã e aos meus amigos. A todos que com amor fizeram parte dessa minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela promessa de estar comigo por todo o sempre e a Virgem Maria sua mãe por me dar forças para realizar os meus anseios;

À minha amada esposa Juliana Ribeiro dos Santos Assis que, cumprindo sua promessa de desligar-se de si mesma para unir-se a mim, me deu suporte necessário para realização desse sonho;

Aos meus pais, Antônio Donizetti de Assis e Rosângela Marcia Oliveira de Assis, juntamente com minha querida irmã, Maria Laura Oliveira de Assis, pelo amor a mim direcionado, isso fez de mim a pessoa que sou hoje;

Ao meu orientador, professor Dr. Sandro Barbosa, pela orientação, oportunidade e sobretudo paciência em guiar-me até aqui com o amor equivalente ao de um pai. Estendo nesse momento a gratidão a Lenise Marques e ao Henrique Barbosa, sua esposa e filho respectivamente, por todo o carinho e receptividade em todas as reuniões profissionais e pessoais realizadas em sua casa;

À minha coorientadora, Dra. Luciene de O. Ribeiro Trindade, pelo apoio científico prestado e ao carinho que se equivale ao de uma irmã;

A todos meus amigos científicos que fiz no Biogen (minha segunda casa) em especial a Pamela Ingrid, João Victor, Daniela Braga, Vitor Betelli, Kamilla Pacheco Gouvêa e Rafaela Sueko por todo o suporte prestado durante a execução desse trabalho, sempre com muito carinho;

Ao grande amigo Wesley Fernandes que além de ter me auxiliado no início desse trabalho, tornou-se um grande amigo, me motivando a crescer sempre;

À Ciomara Leite e Gabriela Ezequiel, técnicas do Biogen, que sempre me auxiliaram;

Aos professores Dr. Thiago Correa e Dr. Diogo Carvalho por toda contribuição intelectual para que esse trabalho pudesse ser realizado;

Aos alunos que orientados pelo professor Dr. Diogo Carvalho, no laboratório de química farmacêutica da Universidade Federal de Alfenas, produziram as moléculas aqui testadas;

A todos professores e funcionários da Unifal que fizeram parte da minha formação.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão desse trabalho.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro [APQ-02123-14]; CAPES e CNPq [Bolsas de pesquisa].

Se não podes entender, crê para que entendas. A fê precede, o intelecto segue
Santo Agostinho

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo compreender o efeito aleloquímico de três cumarinas derivadas do Eugenol [Formileugenol (CA); Formildiidroeugenol (CA1) e Orto-vanila (CA2)] sobre processos fisiológicos e citogenéticos de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Cada cumarina foi dissolvida em uma solução de água destilada, para se obter a solução estoque de concentração 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, após a obtenção da solução estoque cada cumarina foi dissolvida obtendo-se as concentrações de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mais a concentração controle (água destilada). Foram realizados experimentos de fitotoxicidade e citotoxicidade. Para o experimento de fitotoxicidade foram avaliados os parâmetros: germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas normais (NPN), alongamento de raiz (AR), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa fresca (BF). Os aspectos fisiológicos pós-estabelecimento da plântula foram biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS). O índice alelopático (RI) foi avaliado. Para o experimento de citotoxicidade as plântulas foram cultivadas nos mesmos moldes utilizados na fitotoxicidade e as pontas de raiz foram coletadas e armazenadas em Carnoy. As lâminas citológicas foram elaboradas submetidas a avaliação de índice mitótico (IM) e a possível ocorrência de anormalidades cromossômicas (AC). O delineamento foi inteiramente causalizado (DIC), com 3 repetições, com fatorial 3x4x2 (3 moléculas, 4 concentrações e 2 biotestes). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa Sisvar versão 5.6. As análises permitiram constatar a eficiência aleloquímica da CA para os padrões pós-emergentes. Essa molécula na concentração 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou efeito significativo para os parâmetros %G, IVG, AR, CPA, NPN e RI, nos dois biotestes testados, na concentração 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para os parâmetros de citogenotoxicidade nenhuma das moléculas, em nenhuma concentração promoveu alterações cariológicas significativas. Portanto conclui-se que a molécula Formileugenol (CA) possui características suficientes para dar aporte às pesquisas direcionadas ao controle de espécies invasoras, podendo tornar-se um princípio ativo para herbicidas alternativos no controle dessas plantas invasoras.

Palavras-chave: Formileugenol. Fitotoxicidade. Aleloquímico. Índice alelopático. *Lactuca sativa*. *Bidens pilosa*.

ABSTRACT

The present work aimed to understand the allelochemical effect of three coumarins derived from Eugenol [Formileugenol (CA); Formyldihydroeugenol (CA1) and Ortho-vanilla (CA2)] on physiological and cytogenetic processes of *Lactuca sativa* L. and *Bidens pilosa* L. Each coumarin was dissolved in a distilled water solution, to obtain a stock solution with a concentration of 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, after obtaining the stock solution, each coumarin was dissolved, obtaining concentrations of 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, plus the control concentration (distilled water). Phytotoxicity and cytotoxicity experiments were carried out. For the phytotoxicity experiment, the following parameters were evaluated: germinability (G%), germination speed index (IVG), number of normal seedlings (NPN), root elongation (AR), shoot length (CPA) and fresh biomass (BF). The post-establishment physiological aspects of the seedling were fresh biomass (BF) and dry biomass (BS). The allelopathic index (RI) was evaluated. For the cytotoxicity experiment, the seedlings were grown in the same molds used in phytotoxicity and the root tips were collected and stored in Carnoy. Cytological slides were prepared and subjected to evaluation of mitotic index (MI) and the possible occurrence of chromosomal abnormalities (CA). The design was entirely causalized (DIC), with 3 replications, with a 3x4x2 factorial (3 molecules, 4 concentrations and 2 biotests). The data obtained were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and the means compared using the Scott-Knott test at 5% significance using the Sisvar version 5.6 program. The analyzes made it possible to verify the allelochemical efficiency of CA for post-emergence patterns. This molecule at a concentration of 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ showed a significant effect on the parameters %BF, IVG, AR, CPA, NPN and RI, in the two biotests tested, at a concentration of 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. For cytogenotoxicity parameters, none of the molecules, at any concentration, promoted significant karyological changes. Therefore, it is concluded that the Formileugenol (CA) molecule has sufficient characteristics to support research aimed at controlling invasive species, and could become an active principle for alternative herbicides to control these invasive plants.

Keywords: Formyleugenol. Phytotoxicity. Allelochemical. Allelopathic index. *Lactuca sativa*. *Bidens pilosa*.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| PARTE I | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 DESENVOLVIMENTO..... | 12 |
| 2.1 HERBICIDAS..... | 12 |
| 2.2 AS CUMARINAS COMO POTENCIAIS HERBICIDAS..... | 13 |
| 2.3 BIOENSAIOS VEGETAIS APLICADOS AO ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS..... | 14 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 17 |
| 4 OBJETIVOS..... | 18 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 18 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| REFERÊNCIAS..... | 19 |
| PARTE II | 22 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 2.1 OBTENÇÃO DAS MOLÉCULAS..... | 25 |
| 2.2 ENSAIOS DE FITOTOXICIDADE..... | 27 |
| 2.3 ENSAIOS DE CITOGENOTOXICIDADE..... | 27 |
| 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 29 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| 3.1 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE EM <i>Lactuca sativa</i> L..... | 30 |
| 3.2 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE EM <i>BIDENS PILOSA</i> L..... | 35 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 40 |
| 5 AGRADECIMENTOS..... | 40 |
| REFERÊNCIAS | 40 |

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

O anseio moderno por novas tecnologias produtivas na agricultura tem afetado diretamente os ambientes naturais, muitos produtos para controlar as pragas naturais são desenvolvidos, dentre eles se destacam os herbicidas. Inúmeros problemas ambientais recorrentes do uso desses químicos estão sendo observados e cada dia mais evidencia-se a necessidade de tecnologias alternativas que tornem a agricultura mais sustentável. Uma área em ascensão, que visa uma relação sintrópica com ambiente, é a dos herbicidas não convencionais, ou Bio-herbicidas. Alguns são produzidos utilizando como molde químico moléculas do metabolismo natural e princípios ativos isolados de plantas. Tendo em vista essas características esses podem comportar-se com menor nocividade em relação ao meio ambiente (ANESE et al., 2015; CORDEAU et al., 2016).

Para o desenvolvimento dessa nova linha de herbicidas, pesquisas têm sido realizadas no campo da alelopatia, utilizando-se de biomoléculas, capazes de inibir a germinação de plantas invasoras e se caracterizando como potencial herbicida natural (SILVEIRA, 2010). Uma substância que vem se destacando por seu potencial aleloquímico são as cumarinas naturais ou sintéticas (CHUAH; TAN; ISMAIL, 2013). Estas apresentam-se como substâncias de ação aleloquímica que podem afetar os processos de germinação de sementes, o crescimento de plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteína, a atividade de várias enzimas e a perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (MANO, 2006; RAZAVI, 2011).

Para avaliar o efeito dessas moléculas, estudos mais aprofundados são necessários. Estes devem levar em consideração as alterações morfofisiológicas, bioquímicas e genéticas na planta alvo. São poucos os trabalhos que verificam os efeitos das cumarinas em biotestes vegetais avaliando os parâmetros de crescimento inicial e os efeitos citogenotóxicos, principalmente quando há um comparativo entre um bioteste considerado modelo como a alfaca e uma planta daninha, no caso o picão.

Estudar os efeitos fitotóxicos e citogenotóxicos de moléculas naturais ou sintéticas derivadas de produtos naturais, apresenta-se como um novo caminho, dando aporte a novas

tecnologias que podem ser utilizadas nos programas de pesquisa de herbicidas que sejam mais seguros ao meio ambiente e menos nocivo a biota não alvo. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo estudar a atividade biológica de cumarinas inéditas derivadas do Eugenol avaliando seus efeitos sobre a germinação, a morfofisiologia e a citogenética em bioensaios com plantas superiores.

2 DESENVOLVIMENTO

A seguir é apresentada uma revisão de literatura atualizada sobre os temas abordados nesta dissertação, com o objetivo de fornecer embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados obtidos.

2.1 HERBICIDAS

Os herbicidas são produtos químicos fitotóxicos utilizados para a inibição do crescimento ou destruição de diversas ervas daninhas. As ervas daninhas podem ser definidas como plantas que crescem onde não são desejadas. Esta definição possui uma perspectiva antropocêntrica e não é adequada quando se trata de preservação ambiental, entretanto quando estas ervas daninhas não são controladas, podem causar perdas na produção agrícola (NORRIS e KOGAN, 2005).

As plantas daninhas apresentam a característica de competição com a cultura. Segundo o Portal da Embrapa (2018) 15% da produção mundial de grãos é perdida devido à existência de plantas daninhas na lavoura. Para o Brasil as plantas daninhas representam um custo de aproximadamente 9 bilhões anuais, se acrescido das perdas de produtividade (CIRCULAR TÉCNICA SYNGENTA, 2017).

O uso de herbicidas tornou-se uma prática normal em função da eficácia. Devido à extensão da agricultura intensiva em todo o mundo, durante os últimos 30 anos, as variedades e quantidades de herbicidas utilizados para melhorar o rendimento das culturas aumentaram consideravelmente, deixando em alerta possíveis efeitos sobre a saúde humana e do ambiente (GUPTA, 2007; BENITEZ et al., 2006).

São vários os estudos realizados no sentido de se conhecer as espécies com atividades alelopáticas no intuito de aplicação como bioherbicidas, conhecendo-se seus efeitos inibitórios, suas fontes e seu comportamento no ambiente a fim de minimizar os impactos causados pelos herbicidas comerciais atuais (VYVYAN, 2002).

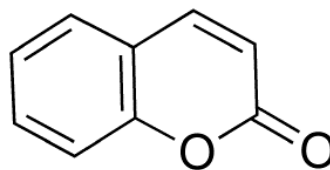
2.2 AS CUMARINAS COMO POTENCIAIS HERBICIDAS

Segundo Razavi (2011), as cumarinas constituem um extenso grupo de metabólitos secundários de origem vegetal, principalmente derivados da via do ácido chiquímico. Essas

substâncias apresentam ampla distribuição em vegetais, especialmente em espécies consideradas superiores, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Kuster e Rocha (2007) ressaltam que a estrutura das cumarinas consiste em lactonas derivadas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo a cumarina per se (1,2-benzopirona) o representante mais simples. O nome "cumarina" tem origem no termo caribenho "cumaru", que é o nome popular da espécie *Dipterix odorata*, pertencente à família Fabaceae.

De acordo com Evans (1996) e Kuster e Rocha (2007), aproximadamente 1300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais até o momento. Essa riqueza de variações estruturais demonstra a diversidade química dessas moléculas na natureza. A literatura científica tem explorado suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas, as quais estão intrinsecamente relacionadas com os padrões de substituição em suas estruturas.

O núcleo básico comum a todas as cumarinas é resultado da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (Fig. 1) (EVANS, 1996; KUSTER; ROCHA, 2007). Essa característica estrutural compartilhada permite a diversificação das atividades biológicas e abre novas perspectivas para o desenvolvimento de herbicidas com propriedades seletivas e mais eficazes. A contínua investigação da diversidade das cumarinas na natureza mantém o interesse científico, impulsionando estudos aprofundados para explorar seu potencial em diversas áreas de pesquisa. A fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona origina o núcleo básico compartilhado por todas as cumarinas.



Cumarina

Figura 1. Estrutura básica das cumarinas, também conhecida como cumarina per se.

Segundo Kuster e Rocha (2007), as cumarinas são benzopironas, metabólitos secundários de origem vegetal, que se subdividem em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas diméricas.

Segundo Kuster e Rocha (2007), as cumarinas simples derivam da 1,2-benzopirona, conhecida como cumarina per se. Estas cumarinas apresentam o núcleo cumarínico com uma variedade de grupos substituintes, incluindo hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, entre outros. Todas as cumarinas, exceto a cumarina per se, possuem substituição hidroxila na posição 7, podendo ser metiladas ou glicosiladas. Além disso, são frequentes as lipidações em diferentes posições do núcleo cumarínico, resultando nas piranocumarinas ou furanocumarinas lineares e angulares, quando lipidadas em C-6 ou C-8, respectivamente. As cumarinas diméricas, também denominadas biscumarinas, consistem em compostos "espelhados", formados pela união de duas moléculas idênticas, como exemplificado pelo dicumarol ou isocumarinas (KUSTER; ROCHA, 2007).

As cumarinas apresentam ampla distribuição em angiospermas, sendo mais prevalentes em estruturas botânicas de maior simplicidade. Contudo, as furanocumarinas, piranocumarinas lineares e angulares, lignocumarinas e cumarinas diméricas são encontradas exclusivamente em famílias botânicas de linhagem mais antiga. A classe Magnoliopsida é aquela que possui a maior diversidade de famílias botânicas que contêm cumarinas em sua composição (KUSTER; ROCHA, 2007).

Em angiospermas, as cumarinas apresentam ampla distribuição, sendo mais prevalentes em estruturas botânicas de maior simplicidade. Contudo, as furanocumarinas, piranocumarinas lineares e angulares, lignocumarinas e cumarinas diméricas são encontradas exclusivamente em famílias botânicas de linhagem mais antiga. A classe Magnoliopsida é aquela que possui a maior diversidade de famílias botânicas que contêm cumarinas em sua composição (KUSTER; ROCHA, 2007).

As cumarinas manifestam variadas atividades biológicas significativas, contribuindo para a persistência das plantas e estão envolvidas em processos como defesa contra agentes fitopatogênicos, resposta a condições abióticas adversas, regulação do estresse oxidativo e controle hormonal (CABELLO-HURTADO et al., 1998; BOURGAUD et al., 2006). Adicionalmente, essas substâncias revelam efeito fitotóxico, fungicida, inseticida, além de apresentarem ações antibacterianas e nematicidas (RAZAVI; ZARRINI; RAD, 2011). Algumas investigações têm relatado atividade anti-HIV das cumarinas (RAVAL et al., 2008; BENG et al., 2011) e exibem atividades antituberculose, antialzheimer, anti-inflamatória, imunossupressora e antimelanogênica (FLAVIN et al., 1996; SANDEEP et al., 2009; KARIMI et al., 2010; BOURGAUD et al., 2006).

Estudos abrangendo cumarinas e seus derivados comprovaram que tais substâncias podem reprimir a germinação, o crescimento e o desenvolvimento inicial, assim como bloquear o ciclo celular mitótico em diversos bioensaios (VYVYAN, 2002; PERGO et al., 2008; RAZAVI, 2011). Diversos trabalhos também mencionam o poder quimioecológico e alelopático das cumarinas sobre a alface, inibindo a germinação, o alongamento radicular e caulinar (RAZAVI; IMANZADEH; DAVARI, 2010; TAKEMURA et al., 2013). Contudo, não foram encontrados estudos na literatura que esclareçam os efeitos das cumarinas sobre os aspectos bioquímicos, ecofisiológicos ou sua ação sobre os pigmentos cloroplastídicos em *Lactuca sativa* L.

2.3 BIOENSAIOS VEGETAIS APLICADOS AO ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os estudos com bioensaios vegetais vem sendo capazes de identificar biomoléculas com ação herbicida. Muitas espécies vegetais cultivadas são utilizadas nestes testes, destacando-se *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. pela facilidade de cultivo, de padronização de métodos e pela facilidade de sua aplicação em diferentes condições *in situ* e *ex situ* (PATUSSI; BÜNDCHEN, 2013; RODRIGUES et al., 2016, SANTOS et al., 2017).

A espécie *Lactuca sativa* L. tem se mostrado uma escolha notável para os estudos quimioecológicos, principalmente devido às suas características favoráveis como bioensaio (RICE, 1984). Sua alta sensibilidade aos compostos testados, mesmo em baixas concentrações, torna-a um excelente indicador para avaliar a ação de substâncias bioativas (SMIDERLE et al., 2001). Além disso, o rápido tempo de germinação, que ocorre em aproximadamente 24 horas, e o crescimento linear em ampla variação de pH facilitam a condução dos experimentos (SIMÕES et al., 2013).

Outra vantagem é a baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos de extratos, permitindo a avaliação precisa dos efeitos dos compostos testados. A rápida fase de estabelecimento da planta, atingindo esse estágio em apenas 21 dias, agiliza o desenvolvimento do bioensaio (MORAES et al., 2015). Adicionalmente, a espécie possui um número reduzido de cromossomos e a presença de cromossomos grandes, características que são propícias para análises citogenéticas e auxiliam na compreensão dos efeitos dos compostos a nível celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUSA et al., 2009).

Esses atributos em conjunto conferem à *Lactuca sativa* L. uma posição proeminente como uma ferramenta confiável e eficiente para os estudos quimioecológicos e para a avaliação de compostos bioativos (RICE, 1984; SMIDERLE et al., 2001; SIMÕES et al., 2013; MORAES et al., 2015; LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUSA et al., 2009). Entretanto, outros estudos já foram realizados com a *Lactuca sativa* L., e embora sejam menos relatados na literatura, demonstram a possibilidade de utilização do bioteste para as análises ecofisiológicas, a quantificação de pigmentos cloroplastídicos e os aspectos bioquímicos (PAULUS et al., 2010; SILVA et al., 2011; AUMONDE et al., 2012).

De modo geral, poucas pesquisas abordando alelopatia, tendo como enfoque a citogenotoxicidade, utilizam como alvo as plantas daninhas. Isso se deve a dificuldade de se obter uma caracterização citogenética adequada dessas espécies, bem como do comportamento de seu complemento cromossômico e do ciclo celular somático.

Na revisão de literatura apresentada por Lousada et al. (2012) o picão-preto (*Bidens pilosa* L.) é apontado como uma das piores plantas daninhas de culturas anuais em mais de 40 países, devido à alta competitividade conferida pelo desenvolvimento em altas densidades, é portanto, uma invasora bastante agressiva, que além de competir com a cultura pode servir de hospedeiro de pragas e doenças, podendo provocar perdas significativas de produtividade em culturas agrícolas.

Essa espécie é originária da América Tropical, herbácea, ereta, com altura entre 40 e 120 cm, de ciclo anual que se propagada via sementes, muito prolífera, de ciclo curto e com capacidade de produzir até três gerações por ano (LORENZI, 2000). E entre as espécies invasoras utilizadas em estudos de prospecção de aleloquímicos para fins biocida, tem se destacado como planta alvo (SILVA, 2012; LOUSADA et al., 2012; JABRAN et al., 2015; COSTA et al., 2018).

Costa et al. (2018) relata que o picão-preto tem germinação ótima em temperaturas de 20° C a 25° C, podendo ser assim comparada ao bioteste *Lactuca sativa* L. que possui características similares, além de ser uma planta daninha muito utilizada para avaliar a fitotoxicidade incluindo a inibição da germinação, e os diferentes parâmetros observados para o crescimento inicial das plantas teste, como o alongamento de raiz, o crescimento de parte aérea e a biomassa.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento da incidência de ervas daninhas resistentes a muitos herbicidas comerciais, há um interesse crescente no desenvolvimento de métodos alternativos baseados em produtos naturais para o controle dessas plantas. Nesse contexto, os metabólitos secundários produzidos por plantas que tenham o efeito alelopático, como as cumarinas, bem como seus derivados sintéticos, podem contribuir para um avanço em estudos que envolvam uma alternativa eficiente para a agricultura no controle de plantas daninhas, permitindo obter produtos de alta qualidade contendo agentes menos agressivos a biota.

As moléculas investigadas neste estudo ainda não foram submetidas a ensaios bioquímicos em plantas, resultando na falta de conhecimento acerca de sua atividade e dos mecanismos de ação nesses sistemas biológicos.

Os compostos químicos investigados neste estudo ainda não foram submetidos a ensaios bioquímicos em plantas, resultando na falta de conhecimento acerca de sua atividade e dos mecanismos de ação nesses sistemas biológicos.

Portanto, é imprescindível avaliar o potencial alelopático das cumarinas sintéticas derivadas do eugenol, cujas propriedades de ação são ainda desconhecidas em modelos vegetais. Essa avaliação fornecerá informações relevantes para pesquisas futuras que visem utilizar essas substâncias como alternativas aos herbicidas convencionais

Portanto, é imprescindível avaliar o potencial alelopático das cumarinas sintéticas derivadas do eugenol, cujas propriedades de ação são ainda desconhecidas em modelos vegetais. Os resultados obtidos nesta avaliação fornecerão informações fundamentais para estudos prospectivos que visam explorar o potencial dessas substâncias como alternativas viáveis aos herbicidas convencionais.

4 OBJETIVOS

A seguir são apresentados os objetivos gerais e específicos da dissertação e do artigo nela contido.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica de três derivados cumarínicos inéditos por meio dos parâmetros de fitotoxicidade e citogenotoxicidade em bioensaios com *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a fitotoxicidade de cumarinas sintéticas utilizando parâmetros de germinação e crescimento inicial em bioensaios vegetais.

Avaliar a citogenotoxicidade de cumarinas sintéticas utilizando analisando possíveis interferências sobre o ciclo celular e o complemento cromossômico de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L.

REFERÊNCIAS

- ANESE, S. et al. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miens roots. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 28-35, 2015.
- AUMONDE, T. Z. et al. Alterações fisiológicas em sementes e metabolismo antioxidativo de plântulas de Alface expostas à ação do extrato das folhas de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. **Interciência**, v. 37, n. 11, p. 845-847. 2012.
- BENITEZ, F. J et al. Photochemical oxixation processes for the elimination of phenyl-urea herbicides in Waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 138, n. 2, p. 278-287, 2006.
- BENG, B. E. et al. Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, 2011.
- BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry**, v. 5, p. 293-308, 2006.
- CABELLO-HURTADO, F. et al. Coumarins in helianthus tuberosus: characterization, induced accumulation and biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 1029-1036, 1998.
- CHUAH T.S., TAN P.K., ISMAIL B.S. Effects of adjuvants and soil microbes on the phytotoxic activity of coumarin in combination with p-vanillin on goosegrass (*Eleusine indica* L.) seedling emergence and growth. **South African Journal Botany**, v. 84, p. 128-133, 2013.
- CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, 2016.
- COSTA N et al. Métodos de controle de plantas daninhas em sistemas orgânicos: breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 25-44, 2018.
- EVANS, W. C. **Trease and evans' pharmacognosy**. 14. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- FLAVIN, M. T. et al. Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (+/-)-calanolide A and its enantiomers. **Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 1303-1313, 1996.
- GUPTA, P. K. Toxicity of herbicides. In: GUPTA, R. C. (Ed) **Veterinary toxicology Basic and clinic principles** USA: Elsevier. 567- 586. 2007.
- JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop. Prot.** v. 72, p. 57-65, 2015.
- KARIMI, G. et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus ferula. **Pharmacology online**, v. 1, p. 566-574, 2010.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2007. p. 537-556.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81. 2009.

LORENZI, Harri. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. **Nova Odessa: Editora Plantarum 440p.-col. illus.. Por Icones, Maps Plant records. Geog**, v. 4, 2000.

MANO, AR de O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. 91f. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2006.

MORAES, R. M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.

NORRIS, Robert F.; KOGAN, Marcos. Ecology of interactions between weeds and arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 479-503, 2005.

PATUSSI, C.; BÜNDCHEN, M. In situ genotoxicity evaluation of triazines using *Tradescantia* clone 4430 Trad-SHM bioassay. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1173-1178, 2013.

PAULUS, D. et al. Produção e indicadores fisiológicos de alface sob hidroponia com água salina. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 2010.

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

RICE, E. L. Allelopathy. 2. ed, **New York: Academic Press**. p. 363, 1984.

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

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

RAZAVI, S. M. Plant Coumarins as Allelopathic Agents. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

RAZAVI, S.M.; ZARRINI, G.; RAD, F.G. Isoarnottinin 4'Glucoside, a Glycosylated Coumarin from *Prangos uloptera*, with Biological Activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, p. 240-243, 2011.

RODRIGUES, G.Z.P.; DALZUCHIO T.; GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta Toxicol Argent.** v. 24, n. 2, p. 97-104, 2016.

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

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

SILVA, M. C. et al. Fontes de esterco e concentração de nutrientes na solução nutritiva em alface cultivada em solo. **Revista Verde**, v. 6, n. 4, p. 41-49. 2011.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 65-74, 2012.

SILVEIRA, P. F. **Efeito alelopático do extrato aquoso da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L).** 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, RN, 2010

SIMÕES, M. S. et al. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.

SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. v. 62, p. 326-333. 2009.

SYNGENTA, **Circular Técnica: Tecnologia é aliada no controle de daninhas, como buva e amargoso** (2017). Disponível em: <https://www.portalsyngenta.com.br/noticiasdocampo/tecnologia-e-aliada-no-controle-de-daninhas-como-buva-e-amargoso#>

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

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

PARTE II

ARTIGO I: ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TRÊS DERIVADOS CUMARÍNICOS INÉDITOS EM BIOENSAIOS VEGETAIS

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

RESUMO

Compreender a importância dos metabólitos secundários nos leva aos compostos cumarínicos, que podem ser encontrados em vários grupos de plantas. Eles desempenham um papel crucial na sobrevivência vegetal, agindo como defesa contra fitopatógenos. Muitos estudos mostram que essas substâncias podem afetar a germinação e o crescimento inicial de outras plantas, mas ainda há poucos que investigaram seus efeitos na genética das células. A toxicidade de compostos cumarínicos podem dar aporte para produção de herbicidas menos tóxicos ao ambiente. A fim de verificar efeitos fitotóxicos e citotóxicos de três cumarinas inéditas [Formileugenol (CA); Formildiidroeuugenol (CA1) e Orto-vanila (CA2)] derivadas do eugenol, realizou-se o presente trabalho. Para a realização do ensaio vegetal utilizou-se plantas alvo *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Cada cumarina foi dissolvida em uma solução de água destilada, para se obter a solução estoque de concentração $5,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir da qual foram obtidas as concentrações de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para os estudos de fitotoxicidade foram avaliados: germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas normais (NPN), alongamento de raiz (AR), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa fresca (BF) e seca (BS). Para citotoxicidade foram avaliados: índice mitótico (IM) e a possível ocorrência de anormalidades cromossômicas (AC). O delineamento foi inteiramente causalizado (DIC), com 3 repetições, com fatorial $3 \times 4 \times 2$ (3 moléculas, 4 concentrações e 2 biotestes). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa Sisvar versão 5.6. Os experimentos de fitotoxicidade demonstraram que a molécula CA foi a mais responsiva, principalmente para $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nos dois biotestes. Os parâmetros %G, IVG, AR, CPA, NPN e RI foram significativos em demonstrar, na concentração $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a eficiência da CA como aleloquímico em ambos biotestes. A análise dos aspectos cariológicos permite inferir que os derivados cumarínicos testados não apresentam efeitos citogenotóxicos. Dessa forma pode-se afirmar que o derivado cumarínico Formileugenol pode vir a ser uma substância promissora, para os programas de controle de plantas daninhas que visem o controle quimioecológico dessas plantas.

Palavras-chave: Formileugenol. Fitotoxicidade. Aleloquímico. Índice alelopático. *Lactuca sativa*. *Bidens pilosa*.

ABSTRACT

Understanding the importance of secondary metabolites leads us to coumarin compounds, which can be found in several groups of plants. They play a crucial role in plant survival, acting as a defense against phytopathogens. Many studies show that these substances can affect the germination and early growth of other plants, but there are still few who have investigated their effects on cell genetics. The toxicity of coumarin compounds can contribute to the production of herbicides that are less toxic to the environment. In order to verify phytotoxic and cytotoxic effects of three new coumarins [Formileugenol (CA); Formyldihydroeugenol (CA1) and Ortho-vanilla (CA2)] derived from eugenol, the present work was carried out. To carry out the plant test, target plants *Lactuca sativa* L. and *Bidens pilosa* L. were used. Each coumarin was dissolved in a distilled water solution, to obtain the stock solution with a concentration of 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, from which concentrations of 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were obtained. For phytotoxicity studies, the following were evaluated: germinability (G%), germination speed index (IVG), number of normal seedlings (NPN), root elongation (AR), shoot length (CPA) and fresh biomass (BF) and drought (BS). For cytotoxicity, the following were evaluated: mitotic index (MI) and the possible occurrence of chromosomal abnormalities (AC). The design was entirely causalized (DIC), with 3 replications, with a 3x4x2 factorial (3 molecules, 4 concentrations and 2 biotests). The data obtained were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and the means compared using the Scott-Knott test at 5% significance using the Sisvar version 5.6 program. The phytotoxicity experiments demonstrated that the CA molecule was the most responsive, mainly to 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the two biotests. The parameters %BF, IVG, AR, CPA, NPN and RI were significant in demonstrating, at a concentration of 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the efficiency of CA as an allelochemical in both biotests. The analysis of karyological aspects allows us to infer that the coumarin derivatives tested do not present cytogenotoxic effects. Therefore, it can be stated that the coumarin derivative Formileugenol could prove to be a promising substance for weed control programs aimed at chemoecological control of these plants.

1. INTRODUÇÃO

As cumarinas são uma classe diversificada de compostos orgânicos heterocíclicos, amplamente investigada como um grupo de metabólitos secundários presentes em várias espécies vegetais, sendo principalmente derivadas da via metabólica do ácido chiquímico (RAZAVI, 2011). Esses compostos cumarínicos são comumente isolados de plantas superiores, mas também podem ser encontrados em fungos e bactérias (KUSTER e ROCHA, 2007).

Elementos cumarínicos são uma classe diversificada de compostos orgânicos heterocíclicos, amplamente investigados como um grupo de metabólitos secundários presentes em várias espécies vegetais, sendo principalmente derivados da via metabólica do ácido chiquímico (RAZAVI, 2011). Esses compostos cumarínicos são comumente isolados de plantas superiores, no entanto, também podem ser encontrados em microrganismos fungiformes e procariotos (KUSTER e ROCHA, 2007). Notavelmente, as cumarinas apresentam uma ampla gama de bioatividades, desempenhando um papel essencial na sobrevivência das plantas, incluindo funções como defesa contra fitopatógenos, resposta ao estresse abiótico, regulação do estresse oxidativo e modulação hormonal (BOURGAUD et al., 2006).

Importante destacar que as cumarinas exibem um impressionante espectro de propriedades farmacológicas e biológicas, abrangendo características antioxidantes, antimicrobianas, antibióticas, anti-inflamatórias, anticoagulantes, antivirais, imunomodulatórias e broncodilatadoras, tornando-as aplicáveis em diversas áreas de pesquisa (RAZAVI; ZARRINI; RAD, 2011). NARUKA e MAHAJAN (2011) destacam que as cumarinas são lactonas derivadas do ácido o-hidroxi-cinâmico, representando uma classe diversificada de metabólitos secundários. O núcleo fundamental de todas as cumarinas resulta da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona. Elas podem ser categorizadas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas.

O núcleo fundamental comum a todos os compostos cumarínicos resulta da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona. Cumarinas miscelâneas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona, furanocumarinas e cumarinas simples são as categorias em que elas podem ser classificadas.

Dentre as cumarinas simples, encontram-se compostos derivados da cumarina per se, com o anel principal das cumarinas e diversos grupos substituintes como hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, entre outros.

Dentre as cumarinas simples, encontram-se compostos derivados da cumarina per se, com o anel principal das cumarinas e diversos grupos substituintes, como alquil, alcóxi, hidróxi, acetóxi, entre outros, podem estar presentes nas cumarinas.

A maioria das cumarinas apresenta uma substituição por um grupo hidroxila na posição 7, que pode sofrer metilação ou glicosilação. Por outro lado, as furanocumarinas possuem um anel furano condensado ao núcleo cumarínico, enquanto as piranocumarinas apresentam um anel pirano, ambas subdivididas em lineares e angulares. As cumarinas com substituintes na posição 3 e 4 são classificadas como cumarinas com substituintes no anel pirona. Já as cumarinas miscelâneas compreendem as biscumarinas, bem como as cumarinas diméricas, exemplificadas pelo dicumarol e isocumarinas (BOURGAUD et al., 2006).

Nessa linha de investigação, é fundamental ressaltar que a diversidade estrutural das cumarinas tem sido amplamente explorada para compreender suas propriedades e atividades biológicas, que abrangem desde efeitos farmacológicos até aplicações industriais (NARUKA e MAHAJAN, 2011). O estudo das cumarinas continua a ser uma área de grande interesse e importância para o avanço do conhecimento científico e das aplicações práticas. As cumarinas têm sido objeto de várias pesquisas que relatam seu potencial alelopático sobre a alfaca, resultando na inibição da germinação, do alongamento caulinar e radicular. Essas substâncias exercem efeitos significativos nos processos fisiológicos e morfológicos da planta, influenciando a interação entre diferentes espécies vegetais e a dinâmica das comunidades. (RAZAVI; IMANZADEH; DAVARI, 2010; TAKEMURA et al., 2013; NIRO et al. 2016). A alelopatia, segundo a Sociedade Internacional de Alelopatia, é definida como a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo-se os efeitos positivos e negativos (MACIAS et al., 2000). Segundo Razavi (2011), a alelopatia é considerada uma estratégia natural em plantas protegendo-as contra os inimigos do ambiente e das plantas competidoras. Este processo envolve os metabólitos secundários de plantas que suprimem o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos circundante.

São poucos estudos que descrevem os mecanismos e modos de ação de aleloquímicos. A maior parte refere-se apenas ao efeito dos compostos secundários sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas e genéticas (IGANCI et al., 2006; REIGOSA et al., 2013). De acordo com Gniazdowska e Bogatek (2005) e Trezzi et al. (2016), a ação dos aleloquímicos pode ser

avaliada em diferentes níveis tais como: nível molecular e bioquímico (a diminuição da síntese de DNA, RNA e proteínas *housekeeping*, o aumento da síntese de proteínas de estresse; o acúmulo de prolina, a inibição da atividade das enzimas); nível estrutural (as alterações na ultraestrutura celular, a inibição da mitose); nível fisiológico (as alterações na fotossíntese, a respiração mitocondrial, a absorção de íons, o crescimento e o desenvolvimento).

Os estudos de fitotoxicidade e citogenotoxicidade são amplamente utilizados com o intuito de verificar a atividade de diferentes compostos sobre os parâmetros fisiológicos e citogenéticos dos biotestes vegetais (ALVIN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; SANTOS et al., 2017; MARTINS et al., 2018). Segundo a literatura podem ser utilizadas como bioensaios, nos estudos sobre os efeitos de aleloquímicos, sementes nativas ou de espécies cultivadas, entre elas se destacam alface e picão (SIMÕES et al., 2013; FREITAS et al., 2015; IQBAL et al., 2019).

São poucos os trabalhos que verificam os efeitos das cumarinas em biotestes vegetais avaliando os parâmetros de crescimento inicial, os efeitos citogenotóxicos e bioquímicos, principalmente quando há um comparativo entre dois bioteste considerados modelo a alface (bioteste convencional) e uma planta daninha, no caso o picão. Nesse sentido determinar o efeitos fitotóxicos e citogentóxicos sobre os biotestes vegetais é considerado de suma importância para subsidiar o desenvolvimento de herbicidas que podem ter um impacto menos negativo sobre o ambiente natural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS MOLÉCULAS INÉDITAS

Todas as cumarinas sintetizadas possuem composições inéditas, caracterizando o trabalho como sendo inovador. Todas as cumarinas utilizadas na presente pesquisa foram sintetizados a partir do eugenol, por meio de uma metodologia clássica amplamente descrita na literatura. Esse processo envolve a conversão do eugenol em um derivado formilado, seguido de ciclo-condensação com compostos dicarbonílicos na presença de uma catálise básica, sob aquecimento, de acordo com padrões na literatura.

O trabalho pode ser considerado inovador, pois a composição das cumarinas utilizadas é inédita. Todas as cumarinas utilizadas nesta pesquisa foram obtidas a partir da

síntese orgânica do eugenol, por meio de uma metodologia clássica amplamente descrita na literatura. Esse processo envolve a conversão do eugenol em um derivado formilado, seguido de ciclo-condensação com compostos dicarbonílicos na presença de uma catálise básica, sob aquecimento, de acordo com padrões na literatura.

É possível observar na Figura 1 que parte da estrutura do eugenol é mantida (cadeia lateral insaturada) e a outra subunidade, a qual está destacada, é envolvida na formação do chamado núcleo cumarínico. Além disso, é descrito o processo de formação dos derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina.

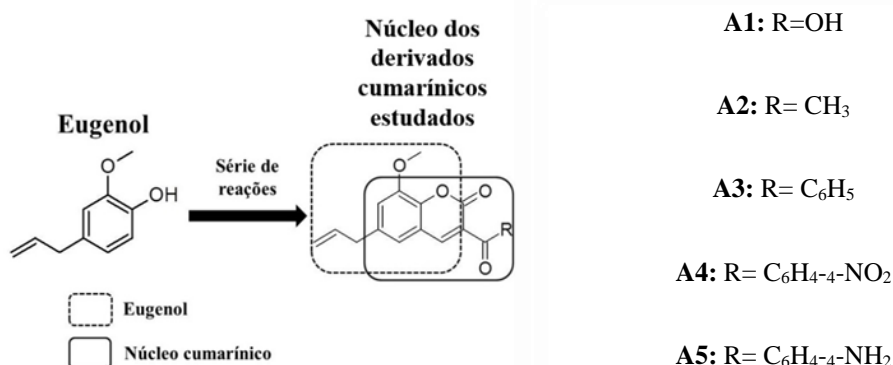


Figura 1 - A síntese empregada na obtenção das cumarinas utilizadas neste estudo foram obtidas tendo como primeira etapa: i) reação de obtenção do intermediário formileugenol: hexamina, ácido acético glacial, 140 °C, seguido de hidrólise com HCl aquoso; ii) condições de reação para obtenção das cumarinas A1-A4: ácido malônico ou B-cetoéster respectivo, piperidina, etanol, 80 °C; condições de reação para obtenção da cumarina A5: redução da cumarina A4 com paládio-carvão + H₂ ou cloreto de estanho hidratado em etanol; condição de reação para obtenção da cumarina A6: anidrido succínico, piridina, 80 °C.

Obtida a formulação dos derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina esses foram modificados com farmacóforos, sendo: CA – Formileugenol; CA1 – Formildiidroeuogenol e CA2 - Orto-vanila (Figura 2).

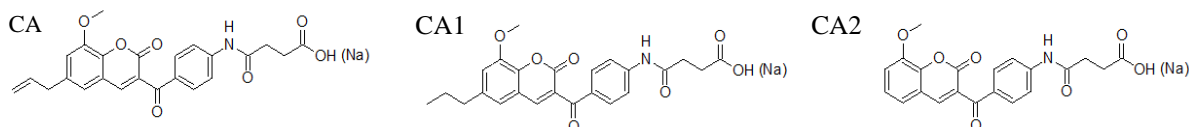


Figura 2. Derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina. CA – Formileugenol (molécula A6), CA1 – Formildiidroeuogenol e CA2 - Orto-vanila.

2.2 ENSAIOS DE FITOTOXICIDADE

As cumarinas foram dissolvidas em água destilada e uma solução estoque na concentração $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi obtida. Posteriormente, foram preparadas soluções nas concentrações ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para execução dos bioensaios de fitotoxicidade.

Para os parâmetros de germinação (porcentual de germinação e índice de velocidade de germinação) sementes de *Lactuca sativa* L. cv Babá de Verão (Feltrin) e *Bidens pilosa* L. (coletadas em populações naturais na região sul do Estado de Minas Gerais) foram colocadas para germinar em placa de Petri contendo duas folhas de papel filtro Witmann nº 2, umedecido com 3 mL de solução nas diferentes concentrações e derivados cumarínicos, utilizou-se como controle negativo água destilada. Os tratamentos foram acondicionados em câmara tipo B.O.D. (Eletrolab 122 FC), a 24°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias para *L. sativa* e 12 dias para *B. pilosa*. Além dos aspectos germinativos também foram avaliados: alongamento de raiz, comprimento de parte aérea, número de plântulas normais, biomassa fresca e biomassa seca.

A taxa de germinação (G) foi obtida através da seguinte equação:

$G = (N/A) \times 100$ G = percentual de germinação;

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar;

A germinação foi avaliada a cada 4 horas durante o decorrer do experimento obtendo-se o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVG} = (N_1/T_1) + (N_2/T_2) + (N_n/T_n)$$

IVG = índice de velocidade de germinação;

N_n = número total de sementes germinadas num intervalo T_n ;

Tn = intervalo de tempo.

A partir desses dados foi calculado o índice de efeito alelopático (RI) e velocidade de germinação (VG) conforme descrito por Borella; Martinazzo; Aumonde (2011).

Para a análise da Non-Protein Nitrogen (NPN), foram consideradas como plântulas o material vegetal que passou pelo processo de germinação e desenvolveu tanto a raiz quanto a parte aérea. Além disso, como plântulas normais, foram selecionadas aquelas que apresentaram características visuais semelhantes ao grupo controle, não exibindo sinais visíveis de efeito tóxico.

Foram consideradas plântulas como material vegetal, para a análise do Nitrogênio Não Proteico (NPN), aquelas que passaram pelo processo de germinação e desenvolveram tanto a raiz quanto a parte aérea. Além disso, como plântulas normais, foram selecionadas aquelas que apresentaram características visuais semelhantes ao grupo controle, não exibindo sinais visíveis de efeito tóxico.

Já para a análise dos parâmetros Absolute Root (AR) e Crown-Root Ratio (CRR), foram escolhidas as 10 maiores plântulas de cada placa. Essas medições foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS® 150 mm), garantindo maior precisão na obtenção dos valores desses parâmetros morfológicos.

Para a análise dos parâmetros Absolute Root (AR) e Crown-Root Ratio (CRR), optou-se pela seleção das 10 maiores plântulas provenientes de cada placa como amostras representativas do material vegetal. As medições foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS® 150 mm), garantindo maior precisão na obtenção dos valores desses parâmetros morfológicos.

Após a pesagem da biomassa fresca em balança analítica (Marte AW220), as plântulas foram levadas para a estufa (Nova Ética 400 ND) com circulação de ar a 45 °C até que o material se encontrasse completamente seco e com massa constante para obtenção da biomassa seca.

2.3 ENSAIOS DE CITOTENOTOXICIDADE

A citogenotoxicidade dos derivados cumarínicos foi avaliada por meio de seus efeitos sobre o comportamento do ciclo celular e do complemento cromossômico dos biotestes

expostos aos diferentes tratamentos, conforme as condições e o delineamento experimental descritos para os Ensaio de Fitotoxicidade.

As sementes germinadas (com protrusão de aproximadamente 2 mm da radícula) foram coletadas, fixadas em Carnoy (etanol e ácido acético, 3:1) e armazenadas a 4 °C para posterior confecção das preparações citológicas e a análise do índice mitótico e a presença de anormalidades cromossômicas, conforme descrito por Miranda et al. (2018) e Santos et al. (2017). Foram analisadas 3000 células por tratamento e o índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observado, multiplicando-se por 100, conforme proposto por Andrade-Vieira et al. (2018) e Pereira et al. (2013), com adaptações. As anormalidades cromossômicas, quando presentes, serão classificadas de acordo com os seguintes critérios:

- Quebras cromatídicas equivalentes a perda de cromátides do cromossomo ou por fragmentação que ocorrem nas cromátides durante a divisão celular;
- Não disjunção dos cromossomos no final da metáfase, formando estruturas denominadas de pontes anafásicas, alterações essas observadas no início da anáfase;
- Perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular causada por desestabilização do fuso acromático.
- Presença de micronúcleo equivalente a uma estrutura de contorno regular, redondo ou oval, e devendo estar dentro do citoplasma de uma célula; o MN deve estar no mesmo plano de foco de observação e nitidamente separado do núcleo.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 3 moléculas, 2 biotestes e 4 concentrações (controle, 400, 800 e 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de significância, utilizando o software Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três derivados cumarínicos deste estudo foram sintetizados a partir de eugenol utilizando um método tradicional descrito na literatura para a obtenção de outras cumarinas. Isto foi feito convertendo eugenol num derivado formilado e subsequente ciclocondensação

deste com compostos de dicarbonilo na presença de um catalisador básico sob calor. Parte da estrutura do eugenol é mantida (cadeia lateral insaturada) e a outra subunidade, que é destacada na Figura 1, está envolvida no chamado núcleo cumarínico. A cadeia lateral carbonila diferencia os seis derivados com base na natureza do grupo R. As cumarinas A1 – A6 foram obtidas com rendimentos de 52 a 96%, e em quantidades suficientes para a realização dos experimentos. Neste trabalho, foram obtidos dois derivados cumarínicos sintéticos, a partir de modificações da molécula A6 (4 - (4- (8-metoxi-6- ácido (prop-2-en-1-il)-2H-cromen-3-carbonil)fenil)amino)-4-oxobutanóico) destacadas na Figura 2, constituindo portanto, os três derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina testados pela primeira vez em bioensaios de plantas.

3.1 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE EM *Lactuca sativa* L.

Os derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina testados mostraram-se potencialmente fitotóxicos aos processos de germinação e crescimento inicial dos bioteste *Lactuca sativa* L., como pode ser verificado na Tabela 1. As três concentrações e proporções provavelmente não foram significativas para levar a um efeito negativo no processo germinativo, considerando-se a emissão da raiz primária e a parte aérea.

Em *Lactuca sativa* a germinação (%G) foi analisada em três períodos diferentes 24 horas, às 48 horas e no sétimo dia. Nesse sentido é possível observar que a porcentagem de sementes germinada, para as moléculas CA1 (Formildiidroeugenol) e CA2 (Orto-vanila) foram estatisticamente iguais ao controle, apesar das variações estatísticas observadas em 24 e 48 horas, o padrão de germinação final não foi afetado, apenas retardado. Entretanto para a molécula CA é possível observar tanto variações ao longo dos pontos analisados quanto da porcentagem germinativa final. Na concentração de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a molécula CA apresenta um comportamento diferente de todas as demais concentrações na germinação final, inibindo aproximadamente 18% da germinação total das sementes quando comparada ao controle. Essa taxa germinativa, aliada às variações de germinação ao longo do período avaliado, afetaram significativamente o índice de velocidade de germinação de forma concentração dependente, uma vez que, conforme a concentração da molécula aumenta o índice fica menor quando comparado ao controle. Esses resultados vão de encontro aos verificados por Colpas et al. (2003) que testando moléculas de cumarina em sementes de soja observaram redução de até 30 % na porcentagem de germinação, além de apresentar aspectos morfológicos totalmente

fora do padrão comparando como grupo controle, como raízes reduzidas e oxidadas. As moléculas cumarínicas possuem efeito que depende da concentração (LUPINI et al. 2014; SALEH, MADANY, GONZÁLEZ, 2015). Um efeito dose concentração pôde ser confirmado para a molécula CA, uma vez que conforme a concentração da molécula foi elevada diferenças estatísticas na maioria dos parâmetros de crescimento inicial foi observada.

Vale sinalizar que a molécula CA, principalmente na concentração de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi a mais responsiva quanto a redução dos parâmetros germinativos (Tabela 1), estes são os principais parâmetros analisados em experimentos de fitotoxicidade (ROSA et al., 2013; MORAES et al., 2015; SILVEIRA et al., 2014). Corroborando com tais resultados, de acordo com Razavi e Zarrini (2010) estudos realizados com cumarinas (7-prenyloxy cumarin, auraptene; concentrações $<100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) demonstram-se que as mesmas são fitotóxicas e apresentaram uma significativa inibição da germinação, redução na porcentagem germinativa, crescimento de plântulas e crescimento de raiz de alface. A explicação para a redução germinativa observada nos dois biotestes (*Bidens pilosa* L. e *Lactuca sativa* L.) pode estar condicionada as reservas nutritivas do endosperma do embrião, que permite a planta promover o crescimento mesmo em condições adversas, entretanto, embora aja um desenvolvimento, este é anormal e a plântula não chega a fase adulta (MIRÓ et. al 1998; FERREIRA e AQUILA 2000), sendo a germinação normalmente o parâmetro menos afetado pelos aleloquímicos, pois as substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, e a radícula uma das regiões mais afetadas (GUSMAN, VIEIRA E VESTENA 2012).

Em estudo realizado por Chuah, Tan, Ismail (2013) observa-se que o uso de cumarinas em combinação com p-vanillin, foram capazes de causar uma redução de 90% na emergência, comprimento da raiz, comprimento da parte aérea e peso fresco, de *Eleusine indica* L.

Para o parâmetro AR a molécula CA foi a mais fitotóxica (Tabela 1), principalmente nas concentrações 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. É possível verificar qualitativamente (Figura 3) o que foi confirmado pela estatística, principalmente na concentração 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para Gusman, Vieira e Vestena (2012) o efeito causado diretamente na radícula se explique por essa região estar em contato direto com o químico, fazendo com que a planta use de mecanismo de proteção como espessamento na parede celular, formação de vacúolos para remediar a ação do agente tóxico.

Outro parâmetro de crescimento afetado foi o comprimento de parte aérea (CPA) em que todas as concentrações, de todas as moléculas, são estatisticamente diferentes quando

comparadas ao controle. Acredita-se que com a diminuição da raiz a planta tentou compensar o CPA. Na concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da molécula CA, apesar do bioteste ter conseguido realizar essa compensação, nesta concentração os valores ficaram estatisticamente iguais ou abaixo de todas as demais concentrações das moléculas, exceto do controle, comprovando que nessa concentração a molécula CA é mais fitotóxica.

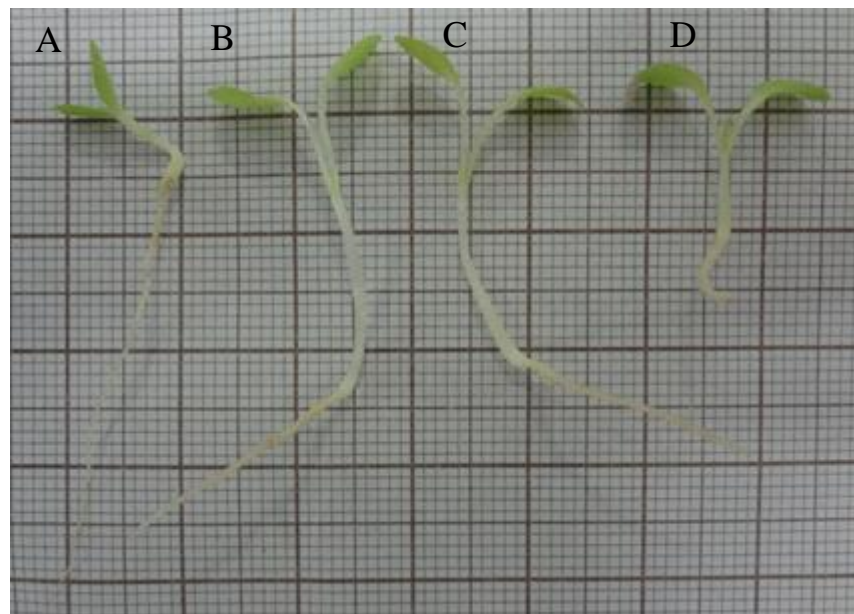


Figura 3. Avaliação dos parâmetros de comprimento de parte aérea em plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas a cumarina CA no sétimo dia após o início do experimento. A. Controle (água destilada), B. $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, C. $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$, D. $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O parâmetro número de plântulas normais (NPN) demonstrou resultado estatisticamente diferente comparado ao controle, isso para a concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da molécula CA. Em testes de fitotoxicidade, geralmente mesmo havendo um desenvolvimento inicial da plantas, em virtude do efeito fitotóxico este é anormal e a plântula não chega a fase adulta (MIRÓ et. al 1998; FERREIRA e AQUILA 2000).

Avaliando os aspectos de crescimento inicial BF e BS também é possível verificar que foram afetados. A maioria das concentrações apresentaram diferença estatística ou se mantiveram iguais ao controle, essa característica sugere que a capacidade hidrostática da planta foi afetada e a assimilação de carbono, também. Observa-se na Tabela 1 que após a secagem foi possível observar diferença estatística no peso, principalmente para a molécula CA, em todas as concentrações. A molécula CA2 na concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ também aumentou peso final da plântula.

Tabela 1. Parâmetros de germinação, crescimento inicial, índice de efeito alelopático e índice mitótico em *Lactuca sativa* L. exposta aos derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina. CA – Formileugenol, CA1 – Formildiidroeuugenol e CA2 - Orto-vanila.

| Tratamento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | G24h (%) | G48h (%) | G7d (%) | IVG | AR (mm) | CPA (mm) | NPN (%) | BF (g) | BS (g) | RI | IM (%) | FAC (%) |
|---|-------------|-------------|------------|---------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Controle | 95,55 a | 98,89 a | 98,89 a | 11,26 a | 19,95 e | 12,87 d | 98,89 a | 0,3300 c | 0,0232 b | - | 33,21 a | 0,1333 a |
| 400 | 95,55 a | 97,78 a | 97,78 a | 10,69 a | 21,54 e | 19,23 b | 98,89 a | 0,7400 a | 0,0267 a | -0,0275 a | 32,30 a | 0,3000 a |
| CA 800 | 82,22 b | 97,78 a | 97,78 a | 8,64 b | 15,74 f | 29,11 a | 98,89 a | 0,7133 a | 0,0259 a | -0,0822 a | 30,73 a | 0,1666 a |
| 1600 | 38,89 c | 81,11 b | 81,66 b | 5,11 c | 10,22 f | 16,69 c | 86,66 b | 0,4400 b | 0,0257 a | -0,3349 b | 32,46 a | 0,1666 a |
| 400 | 88,89 b | 98,89 a | 98,89 a | 10,49 a | 35,00 c | 15,53 c | 98,89 a | 0,3533 c | 0,0226 b | -0,0502 a | 32,21 a | 0,1500 a |
| CA1 800 | 95,55 a | 100,00 a | 100,00 a | 11,05 a | 49,86 b | 15,05 c | 100,00 a | 0,4366 b | 0,0242 b | -0,0172 a | 29,58 a | 0,2166 a |
| 1600 | 95,55 a | 98,89 a | 98,89 a | 11,14 a | 58,02 a | 17,61 b | 98,89 a | 0,3800 c | 0,0228 b | -0,0240 a | 31,96 a | 0,0833 a |
| 400 | 88,89 b | 100,00 a | 100,00 a | 11,03 a | 27,27 d | 17,76 b | 100,00 a | 0,4333 b | 0,0233 b | -0,0429 a | 32,21 a | 0,1666 a |
| CA2 800 | 94,44 a | 98,89 a | 98,89 a | 11,00 a | 22,23 e | 21,14 b | 98,89 a | 0,5200 b | 0,0218 b | -0,0283 a | 31,28 a | 0,1666 a |
| 1600 | 90,00 b | 100,00 a | 100,00 a | 10,62 a | 27,76 d | 18,87 b | 100,00 a | 0,6733 a | 0,0265 a | -0,0388 a | 32,21 a | 0,1833 a |

Porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas normais (NPN), alongamento de raiz (AR), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa fresca (BF), biomassa seca (BS), índice alelopático (RI), índice mitótico (IM), Frequência de anormalidades cromossômicas (FAC). Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O índice alelopático (RI) foi analisado e verificou-se que todas as 3 moléculas apresentaram efeito alelopático quando comparadas com o controle, sendo a molécula CA na concentração de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a mais significativa. Esse efeito alelopático confirmam todos os parâmetros afetados ao longo do experimento.

O índice mitótico e a frequência de anormalidades cromossômicas não demonstraram variações estatisticamente significativas.

3.2 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE EM *Bidens Pilosa* L.

Os dados para os parâmetros porcentagem de germinação (%G) de *Bidens pilosa* L. levam em consideração dois espaços de tempo 96 horas e 12 dias. Até às 96 horas iniciais a molécula CA (Formileugenol) na concentração de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diminui significativamente a germinação do bioteste enquanto que na concentração 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o resultado foi ainda mais incisivo pois nenhuma semente germinou. Entretanto quando analisamos a germinação no décimo segundo dia apenas duas moléculas apresentam variação estatística significativas a molécula CA (Formileugenol) em todas as suas concentrações e a molécula CA1 (Formildiidroeuugenol) nas concentrações 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Valeu destacar aqui que a concentração de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da molécula CA inibiu cerca de 40% da germinação do bioteste (Tabela 2).

Segundo Lessa et al. (2017) os extratos aquosos de folhas de *Amburana cearensis* e *Plectranthus barbatus* apresentaram caráter inibitório na porcentagem de germinação de *Amaranthus deflexus*. Tal efeito é indicado pela presença de cumarinas nestes extratos, podendo esta ser o princípio ativo da espécie. Este estudo vai de encontro com a pesquisa realizada por Mano (2006) que testou extratos obtidos através de folhas secas de cumaru (*Amburana cearensis*), e estes apresentavam como princípio ativo a cumarina, com potencial alelopático de caráter inibitório sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho.

Com base na literatura, alterações na inibição dos padrões de germinação refletem em possíveis alterações de rotas metabólicas inteiras as quais modificam processos importantes para o desenvolvimento do embrião, afetando sua ontogênese (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Estas alterações podem estar relacionadas com efeitos sobre a permeabilidade de membranas,

transcrição e tradução de material genético, as reações enzimáticas e a respiração celular (LUPINI et al., 2010).

Para o parâmetro de índice de velocidade de germinação (IVG) os resultados demonstram que a molécula CA (Formileugenol), em todas as concentrações, foi estatisticamente diferente do controle e o efeito foi concentração dependente. Já na molécula CA1 (Formildiidroeuugenol) todas as concentrações diferiram estatisticamente do controle, mas não diferiram entre si.

Mano (2006) testando um extrato de cumaru na concentração (0,19 mg/mL) evidenciou uma redução na germinação das sementes, desenvolvimento e crescimento das plântulas de picão-preto. E na concentração de (6,25 mg/mL) de seu extrato o comprimento radicular foi afetado, inclusive nas plântulas de alface. Essa redução radicular pode ser verificada para a maior concentração (1600 mg/mL) da molécula de cumarina CA, que afetou o comprimento radicular em plântulas picão (Tabelas 2).

A raiz apresenta função de suporte e absorção de nutrientes pela planta (TAIZ; ZEIGER, 2013), assim quanto maior o comprimento da raiz maior sua superfície de absorção (RATSCH, 1986). É possível observar que as moléculas testadas no experimento comprometeram as plântulas, evidenciando seu poder alelopático. Isso explica o desenvolvimento anormal da planta, que pode ser verificado nas Figura 4. Acredita-se que uma plântula com o eixo radicular tão reduzido terá dificuldades de chegar à fase adulta.

Em estudo com cumarinas sintéticas Araniti (2015) observou que estas apresentaram forte atividade fitotóxica em plântulas de *Arabidopsis thaliana*. Este potencial alelopático das cumarinas sintéticas foram capazes de afetar o crescimento radicular, causando danos na morfologia e anatomia da raiz, além de diminuir a porcentagem de germinação. No presente estudo é possível avaliar qualitativamente anormalidades no sistema radicular como as relatadas por Araniti (2015), em que as raízes primárias estavam atrofiadas e/ou escurecidas (Figura 4). O autor ressalva que estes efeitos foram duas vezes maiores em cumarinas sintéticas que em cumarinas naturais. Corroborando com o potencial alelopático das cumarinas sintéticas aqui testadas.

Segundo Reynolds (1977) moléculas sintéticas podem ter ação fitotóxica sobre outros padrões pós germinação e não apenas sobre o processo de germinação propriamente dito, podendo agir sobre vários aspectos do crescimento. Neste estudo isso pôde ser confirmado uma vez que, para o parâmetro alongamento de raiz (AR) as concentrações de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a molécula CA possuem valor estatisticamente diferente

comparando com o controle, sendo estas concentrações responsáveis pela diminuição do comprimento radicular (Tabela 2). Colpas et al. (2003) observou características muito similares para sementes de soja, as sementes tiveram suas raízes reduzidas. Uma hipótese de redução radicular é proposta por Carmo et al. (2007) que relata ser comum encontrar redução no tamanho do eixo hipocótilo-raiz das plântulas submetidas a diferentes aleloquímicos pois estão previamente mais expostas ao tratamento, tornando-se o parâmetro mais afetado. A redução da radícula pode ser claramente visualizada na Figura 4, principalmente para a concentração $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da molécula CA.

Outra proposição com relação à redução radicular foi feita por Lupini et al. (2010) que sugeriu que a redução ocasionada pelas cumarinas na região radicular poderia estar relacionada ao transporte polar da auxina. Lupini et al. (2014) utilizando uma espécie de *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificada (transporte da auxina) comprovaram essa hipótese.

Tabela 2. Parâmetros de germinação, crescimento inicial, índice de efeito alelopático e índice mitótico em *Bidens pilosa* L. exposta aos derivados cumarínicos anidrido succínico/piridina. CA – Formileugenol, CA1 – Formildiidroeuugenol e CA2 - Orto-vanila.

| Tratamento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | G96h (%) | G12d (%) | IVG | AR (mm) | CPA (mm) | NPN (%) | BF (g) | BS (g) | RI | IM |
|--|---------------------------|---------------------------|------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| Controle | 31,67 c | 58,89 a | 1,77 a | 22,74 c | 38,68 a | 58,89 a | 0,2533 a | 0,0266 a | - | 35,23 a |
| 400 | 18,33 e | 40,00 b | 1,59 b | 11,99 e | 30,01 b | 55,00 a | 0,2800 a | 0,0266 a | -0,3300 c | 35,96 a |
| CA 800 | 8,33 f | 38,33 b | 1,07 c | 13,53 e | 36,01 a | 38,33 b | 0,2200 a | 0,0266 a | -0,2900 c | 34,81 a |
| 1600 | 0,00 f | 35,55 b | 0,27 d | 4,31 f | 7,95 d | 35,55 b | 0,1966 a | 0,0233 a | -0,7600 d | 35,68 a |
| 400 | 33,33 c | 55,00 a | 1,51 b | 31,16 b | 35,33 a | 50,00 a | 0,2500 a | 0,0300 a | -0,1400 c | 35,81 a |
| CA1 800 | 18,33 e | 43,33 b | 1,39 b | 30,95 b | 30,78 b | 43,33 b | 0,2700 a | 0,0266 a | -0,1300 c | 34,95 a |
| 1600 | 25,00 d | 43,33 b | 1,40 b | 37,90 a | 26,19 c | 43,33 b | 0,2200 a | 0,0266 a | -0,2200 c | 34,96 a |
| 400 | 51,66 a | 60,00 a | 2,12 a | 19,50 c | 31,66 b | 54,44 a | 0,2700 a | 0,0300 a | 0,0900 b | 34,16 a |
| CA2 800 | 38,33 c | 56,66 a | 1,82 a | 16,08 d | 32,29 b | 48,88 a | 0,2633 a | 0,0266 a | -0,2866 c | 35,98 a |
| 1600 | 45,00 b | 55,00 a | 2,01 a | 13,48 e | 37,53 a | 50,00 a | 0,2466 a | 0,0300 a | 0,3500 a | 39,46 a |

Porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas normais (NPN), alongamento de raiz (AR), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa fresca (BF), biomassa seca (BS), índice alelopático (RI), índice mitótico (IM). Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O parâmetro comprimento de parte aérea (CPA) apresentou variações estatísticas. A mais representativa é para a concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na molécula CA (Formileugenol). Tanto os valores de CPA quanto os valores de AR na maior concentração da molécula CA apresentam valores muito inferiores aos demais tratamentos (Figura 4).

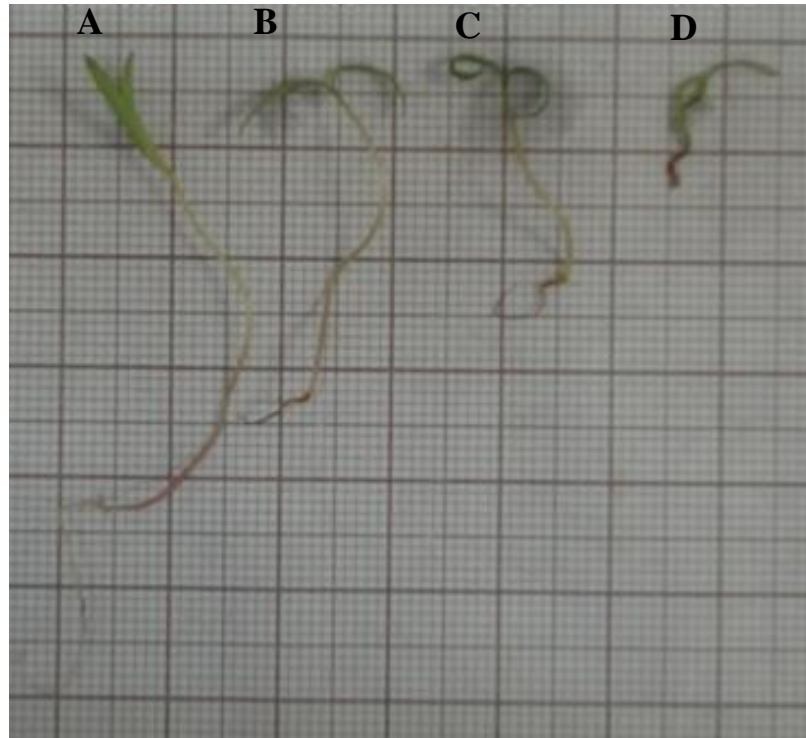


Figura 4. Avaliação dos parâmetros de comprimento de parte aérea (CPA) e Alongamento de raízes (AR) em plântulas de *Bidens pilosa* L. expostas a cumarina CA no sétimo dia após o início do experimento. A. Controle (água destilada), B. $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, C. $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$, D. $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para os parâmetros número de plântulas normais (NPN) é possível destacar a molécula CA e a CA1 na concentração de $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Bidens pilosa* L. essa característica anormal das plantas é resultado dos efeitos observados nos parâmetros germinativos e de crescimento inicial da planta .

Para biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS) não há resultados estatisticamente diferentes.

Os resultados do índice alelopático (RI) demonstram que a molécula que apresenta índice alelopático mais expressivo é a CA (Formileugenol) na concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ tanto em *Bidens pilosa* L, quanto em *Lactuca sativa* L.. Esse resultado mostra claramente um efeito alelopático das moléculas cumarínica, efeito esse confirmado por vários autores (TAKEMURA et al., 2013, ARANITI, 2015; LESSA et al. 2017;)

Para análise citotóxica não houve variação estatisticamente significativa para o parâmetro índice mitótico (IM). Para o Bioteste *Bidens pilosa* L. não foram encontradas anormalidades cromossômicas.

4. CONCLUSÃO

A molécula CA foi a que causou maior efeito fitotóxico, principalmente na concentração de 1600 µg.mL⁻¹, para os biotestes de *L. sativa* e *Bidens pilosa* L., sendo responsável por afetar todos os parâmetros germinativos e os parâmetros de crescimento inicial.

Os derivados cumarínicos testados não apresentaram efeitos citogenotóxicos.

Diante dos resultados sugere-se a molécula CA como precursora para os estudos de obtenção de bioherbicidas.

5. AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

ALVIN, L. B. et al. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente e Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cytogenetic bioassays as tools to distinguish between toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. **Revista de Biologia Tropical**, v. 66, p. 495-502, 2018.

ANYA A.L. et al. Allelochemicals from *Staurantus perforatus*, a Rutaceae tree of the Yuctan Peninsula, Mexico. **Phytochemistry**, v. 66, p. 487-494, 2005.

ARANITI, F. et al. Phytotoxic potential and biological activity of three synthetic coumarin derivatives as new natural-like herbicides. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17883-17902, 2015.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 3, p. 398-404, 2011.

BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry**, v. 5, p. 293-308, 2006.

CARMO, F. M. S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 697-705, 2007.

CHUAH, T. S.; TAN, P. K.; ISMAIL, B. S. Effects of adjuvants and soil microbes on the phytotoxic activity of coumarin in combination with p-vanillin on goosegrass (*Eleusine indica* L.) seedling emergence and growth. **South African Journal of Botany**, v. 84, p. 128-133, 2013.

COLPAS, F. T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 46, n.2, p.155-161, 2003.

DASTAN, D. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*. **Indian Crops Production**, v. 55, p. 43-48, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, p. 109-112, 2014.

FERREIRA, A. G, BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

FREITAS, J. V et al. Prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2015.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Biotemas**, v. 25, p. 37-48, 2012.

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

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2007. p. 537-556.

LESSA, B. F. T. et al. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de folhas de *Amburana cearensis* e *Plectranthus barbatus* na germinação de *Amaranthus deflexus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 79-86, 2017.

LUPINI, A. et al. Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. **Plant Signal Behavior**, v. 5, n. 10, p. 1395-1400, 2010.

LUPINI A. et al. Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, v. 74, p. 23-31, 2014.

MANO, A. R. O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. 91f. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 2006.

MARTINS, M. Physicochemical characterization of chitosan and its effects on early growth, cell cycle and root anatomy of transgenic and non-transgenic maize hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 1, p. 56-66, 2018.

MIRÓ, C. et al. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1261-1270, 1998.

MORAES, R. M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.

NARUKA, S. G.; MAHAJAN, S. S. Conventional and microwave assisted synthesis and qsar studies of coumarinylchalcones as potent antimicrobial agents. **Int. J. Research Pharmaceutical Chemical**, v. 4, p. 879-890, 2011.

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

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agroambiente On-line**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

RAZAVI, S. M. Plant Coumarins as Allelopathic Agents. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

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

RAZAVI, S. M.; ZARRINI, G.; RAD, F. G. Isoarnottinin 4'glucoside, a glycosylated coumarin from prangos uloptera, with biological activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, p. 240-243, 2011.

RATSCH, H. C.; JOHNDRO, D. Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 6, n. 3, p. 267-276, 1986.

REYNOLDS, T. Comparative effects of aromatic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. **Annals of Botany**, v. 42, p. 419-427, 1977.

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

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

SALEH, A. M., MADANY, M. M.Y., GONZÁLEZ, L. The effect of coumarin application on early growth and some physiological parameters in faba bean (*Vicia faba* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 233-241, 2015.

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

ROSA, J. M. et al. Allelopathic effect of *Salix* spp. on seeds germination and seedling development of *Raphanus sativus* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 3, p. 255-263, 2013.

SILVEIRA, B. D. et al. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze allelopathic activity on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 79-85, 2014.

SIMÕES, M. S. et al. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TREZZI, M. M. et al. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture, **Journal of Plant Interactions**, v. 11, n. 1, p. 53-60, 2016.