

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**UNIFAL-MG**

**ENNIO MIRANDA BARROSO**

**ALELOPATIA E CITOGENOTOXIDADE DE EXTRATOS DE DIFERENTES  
ESTRUTURAS DE *Garcinia brasiliensis* Mart. (CLUSIACEAE)  
EM BIOENSAIO COM *Lactuca sativa* L.**

**Alfenas - MG**

**2014**

**ÊNIO MIRANDA BARROSO**

**ALELOPATIA E CITOGENOTOXIDADE DE EXTRATOS DE DIFERENTES  
ESTRUTURAS DE *Garcinia brasiliensis* Mart. (CLUSIACEAE)  
EM BIOENSAIO COM *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG. Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. Sandro Barbosa

**Co-orientador:** Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho (ICB/UNIFAL-MG)

**Colaboradores:** Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos (UFV), Prof. Dr. Luís Alberto Beijo (ICEX-UNIFAL-MG) e Ana Carolina de Azevedo Dias (Bolsista PIBID-Ciências Biológicas)

**Alfenas - MG  
2014**

Barroso, Ênnio Miranda.

Alelopatia e citogenotoxicidade de extratos de diferentes estruturas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae) em bioensaio com *Lactuca sativa* L. / Ênnio Miranda Barroso. - Alfenas, 2014.

49 f. -

Orientador: Sandro Barbosa

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Clusiaceae. 3. Alface. 4. Sementes.  
5. Feromônios. I. Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD: 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG  
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas - MG CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)  
www.unifal-mg.edu.br/ppgecoambiental/



ÊNIO MIRANDA BARROSO

“ALELOPATIA E CITOGENOTOXICIDADE DE EXTRATOS DE DIFERENTES  
ESTRUTURAS DE *GARCINIA BRASILIENSIS* MART. (CLUSIACEAE) EM  
BIOENSAIOS COM *LATUCA SATICA* L.”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre em  
Ecologia e Tecnologia Ambiental pela  
Universidade Federal de Alfenas. Área de  
Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Aprovado em: 27 / 02 / 2014

Prof. Dr. Sandro Barbosa  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos  
Instituição: UFJF

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcelo Polo  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

## RESUMO

Com as novas necessidades da agricultura nos dias atuais o uso de herbicidas sintéticos se tornou indispensável para se obter uma alta produtividade e livrar as lavouras de pragas e ervas daninhas. O potencial para o uso de produtos naturais de plantas como herbicidas é grande, sobretudo na agricultura agroecológica, seja para o uso direto ou como base para a síntese de novas moléculas herbicidas, uma vez que, embora o método de controle químico seja prático, possui uma série de limitações. Com isso o objetivo do trabalho foi averiguar os efeitos de extratos de folha, pericarpo e sementes de Bacupari em bioensaios utilizando Alface (*Lactuca sativa* L.) como planta-alvo, buscando compreender a ação dos aleloquímicos e ampliar o conjunto de informações sobre a ação fitotóxica de extratos dessa planta. Os biotestes com cipselas de Alface foram conduzidos em câmara de germinação tipo B.O.D, a  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo 12 h durante 96 h, com extratos aquoso de folha e etanólicos de folha, pericarpo e de sementes em diferentes concentrações, sendo utilizado como controle água destilada. Os testes de germinabilidade (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM) foram feitos com quatro repetições de 30 sipselas de Alface cada uma expostas aos diferentes tratamentos. As pontas de raiz foram coletadas, fixadas em Carnoy e armazenadas até a confecção das preparações citológicas onde foram contadas 3000 células por tratamento para avaliação do índice mitótico (IM), além da avaliação de anormalidades cromossômicas. Um segundo experimento foi conduzido utilizando os mesmos tratamentos visando analisar a fitotoxicidade do Bacupari tomando como variáveis o comprimento de 10 raízes de cada repetição e a biomassa fresca e seca das plântulas obtidas após 96 horas de cultivo. Os extratos aquosos de folha e etanólico de pericarpo apresentaram um efeito redutor da germinação, do crescimento inicial, do índice mitótico e um aumento do índice de anormalidades cromossômicas, dependentes da concentração, exercendo uma ação fitotóxica e citotóxica sobre o bioteste. Contudo, o mesmo não foi observado para os dados dos extratos etanólicos de folha e semente, que interferiram apenas no crescimento inicial e no índice mitótico, caracterizando uma ação citotóxica dos compostos bioativos presentes neste extrato.

**Palavras-chave:** Fitotoxicidade. Bacupari. Alface. Sementes. Aleloquímicos.

## ABSTRACT

With the changing needs of agriculture nowadays the use of synthetic herbicides has become indispensable to obtain high productivity and rid the crops from pests and weeds. The potential for the use of natural plant products, as herbicides is large, particularly in agriculture agroecological, either for direct use or as the basis for the synthesis of new herbicidal molecules, since although chemical control method is practical, has a number of limitations. Therefore, the objective of the study was to evaluate the effects of extracts of leaf, pericarp and seed Bacupari in bioassays using Lettuce (*Lactuca sativa* L.) as a target plant, trying to understand the action of allelochemicals and expand the set of information about the action phytotoxic extracts of this plant. The bioassays with cypselae Lettuce were conducted in a germination chamber BOD at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 h photoperiod for 96 h with aqueous and ethanolic leaf extracts of leaf, pericarp and seed in different concentrations, being used as a control distilled water. Tests for germination (G), germination speed index (GSI) and mitotic index (MI) were made with four replicates of 30 seeds lettuce each exposed to different treatments. The root tips were collected, fixed in carnoy and stored until the making of cytological preparations in which 3000 cells were counted per treatment for evaluation of mitotic index (MI), besides the evaluation of chromosomal abnormalities. A second experiment was conducted using the same treatments to examine the phytotoxicity of Bacupari taking as variables the length of 10 roots of each repetition and the fresh and dry biomass of seedlings obtained after 96 hours of culture. The aqueous and ethanolic leaf extracts of pericarp showed reducing effect germination, initial growth, the mitotic index and an increased rate of chromosomal abnormalities, the seeds of Lettuce, concentration dependent, exerting phytotoxic and cytotoxic action on the bioassay. However, the same was not observed for the data of the ethanol extract of leaf and seed, which acted only on the initial growth and inhibition of mitotic index, featuring a cytotoxic action of bioactive compounds present in this extract.

**Keywords:** Phytotoxicity. Bacupari. Lettuce. Seeds. Allelochemicals.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 DESENVOLVIMENTO.....	9
2.1 <i>Garcinia brasiliensis</i> MART: Aspectos gerais e ocorrência.....	9
2.2 Aspectos químicos e farmacológicos.....	10
2.3 Alelopatia.....	13
3 JUSTIFICATIVA.....	15
4 OBJETIVO GERAL.....	16
4.1 Objetivos específicos.....	16
5 REFERÊNCIAS.....	17
SEGUNDA PARTE.....	22
ARTIGO 1 - Plant growth inhibitor and cytogenotoxicity activities by leaf extracts from <i>Garcinia brasiliensis</i> Mart. (Clusiaceae) on bioassays with <i>Lactuca sativa</i> L.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUCTION.....	24
MATERIAL E METHODS.....	25
RESULTS AND DISCUSSION.....	27
ACKNOWLEDGMENTS.....	32
REFERENCES.....	33
ARTIGO 2 – AÇÃO ALELOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CASCA DE FRUTOS E SEMENTES DE <i>Garcinia brasiliensis</i> Mart. (Clusiaceae) EM BIOENSAIO <i>Lactuca sativa</i> L.....	37
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

## 1 INTRODUÇÃO

Neste início de século, o aproveitamento de recursos naturais vem assumindo um valor estratégico. A organização mundial de saúde (OMS) estima que 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem das substâncias naturais para suas necessidades básicas e que, cerca de 85% envolve o uso de plantas como fontes dessas substâncias. Por isso, o trabalho de preservação e estudo de espécies vegetais vem se destacando e ganhando importância nos países em desenvolvimento e do chamado Primeiro Mundo (SIMÕES, 2000).

Na natureza existem milhares de compostos bioativos com propriedades inexploradas. Muitos deles são metabólitos secundários gerados por plantas como resultado de uma coevolução, que frequentemente geram efeitos em outros organismos e, em muitos casos, possuem a função de compostos bioquímicos de defesa ou aleloquímicos. Dessa maneira, numerosas plantas vêm sendo usadas, principalmente no meio rural, como remédios, repelentes de insetos, venenos usados na pesca, entre outras finalidades (SOUZA FILHO, 2006).

Com as novas necessidades da agricultura nos dias atuais o uso de herbicidas sintéticos se tornou indispensável para se obter uma alta produtividade e livrar as lavouras de pragas e ervas daninhas. Esses herbicidas sintéticos podem causar vários efeitos danosos ao meio ambiente e também pode induzir resistência em plantas daninhas.

O potencial para o uso de produtos naturais de plantas como herbicidas é grande, sobretudo na agricultura agroecológica, seja para o uso direto ou como base para a síntese de novas moléculas herbicidas, uma vez que, embora o método de controle químico seja prático, possui uma série de limitações. O uso de herbicidas sintéticos, algumas vezes, leva à poluição ambiental, além de causar efeitos inerentes, como resistência (DUKE et al., 2000; HACHINOHE; MATSUMOTO, 2007).

O estudo químico de plantas, sobretudo aquelas pertencentes à flora brasileira, constitui-se numa estratégia economicamente importante para o futuro da indústria de corantes, medicamentos e defensivos agrícolas, além de servir como direcionador do desenvolvimento sustentável do país (PINTO et al., 2002).

Substâncias naturais com efeitos alelopáticos vêm se tornando uma alternativa ecológica para o controle das pragas agrícolas. Com a descoberta de novos compostos o desenvolvimento de novos produtos agrícolas, que tenham uma maior eficiência e menor efeito poluente, se torna cada vez mais viável.



## 2 DESENVOLVIMENTO

Nesse tópico vamos abordar: características botânicas, aspectos químicos, farmacológicos do Bacupari. Assim como bioensaios e biotestes aplicados em estudos de alelopatia.

### 2.1 *Garcinia brasiliensis* Mart: Aspectos gerais e ocorrência

*Garcinia brasiliensis* pertence à família Clusiaceae ou Guttiferae, que é composta por cerca de 40 gêneros e engloba mais de 1.000 espécies que ocorrem nas regiões tropicais do globo. Pode também ser encontrada na literatura botânica como *Rheedia brasiliensis* Planch. & Triana. Estudos de tais espécies têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e compostos, assim como a família a que pertencem. Destacam-se as benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas, que têm demonstrado ações como princípios ativos contra várias doenças. Além disso, encontram-se nesses gêneros importância econômica para a produção de madeiras, óleos essenciais e resinas. (ALMEIDA et al., 2008; BRAZ-FILHO et al., 1970; CRUZ et al., 2006; DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1988; DI STASI, 2002; YAMAGUCHI et al., 2000).

As plantas desta família são lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência, flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

A espécie *Garcinia brasiliensis* é nativa da região Amazônica, mas é cultivada em todo o território brasileiro sendo conhecida popularmente como Bacupari, Bacuparil, Bacuri, Porocó e Bacuripari. Na medicina popular as folhas da *Garcinia brasiliensis* são utilizadas no tratamento de inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1978).

A floração ocorre nos meses de junho a janeiro, frutificando nos meses de novembro a maio. É uma espécie bem distribuída no interior de ecossistemas florestais, sendo também muito ornamental, especialmente quando carregada com seus frutos amarelos (BACKS; IRGANG, 2004).

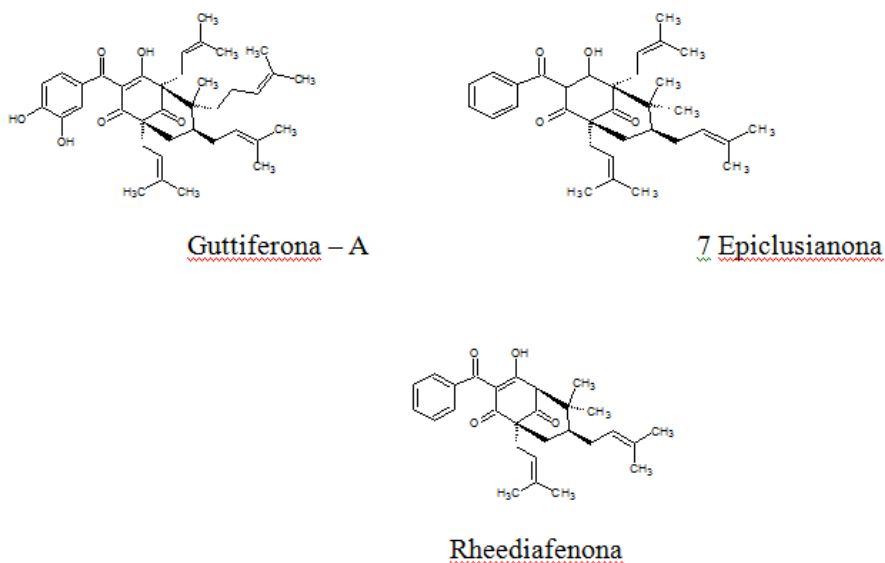
## 2.2 Aspectos químicos e farmacológicos

Estudos fitoquímicos pioneiros do caule e da raiz descreveram o isolamento de 1,5-diidroxixantona, lupeol, ácido betulínico, reediixantona B, 1,7-diidroxixantona, isoreediixantona B, reediacromenoxantona, 8-desoxigartanina, piranojacareubina, 7-preniljacareubina e b-sitosterol (BRAZ-FILHO et al., 1970; DELLE MONACHE et al., 1983).

Posteriormente, Santos et al., (1999) isolaram alguns constituintes na forma pura e/ou em misturas a partir do fruto dessa planta. Do extrato hexânico da polpa foi isolada uma mistura de sitosterol e estigmasterol e no extrato etanólico identificou-se por cromatografia em papel os carboidratos glicose, galactose e frutose. O extrato hexânico da casca do fruto forneceu uma nova benzofenona tetraprenilada, a 7-epiclusianona e uma fração líquida contendo os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\gamma$ -cadineno e cadineno. O ácido oleanólico foi isolado do extrato diclorometânico da casca do fruto. A transesterificação dos extratos etéricos das sementes, da polpa e da casca forneceu os ésteres metílicos dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, que foram identificados por cromatografia gasosa. As estruturas das substâncias sitosterol, estigmasterol, 7-epiclusianona e ácido oleanólico foram deduzidas com base na análise de dados espectrais de RMN (1D e 2D).

Em *Garcinia brasiliensis* as benzofenonas polipreniladas têm merecido considerável atenção. Essas substâncias caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona substituído por grupo(s) isoprenila(s) (3-metil-2-butenila). Adicionalmente, muitos dos representantes desta classe apresentam um padrão de oxigenação tríplice em um dos anéis aromáticos do cerne difenilmetanona e uma ciclização intramolecular, que juntos são responsáveis pela formação do anel biciclo[3.3.1]noneno (MARTINS, 2008). Três benzofenonas polipreniladas naturais são conhecidas nesta planta (Figura 1): guttiferona A, isolada pela primeira vez em 1992 (GUSTAFSON et al., 1992); a supracitada 7-epiclusianona (SANTOS et al., 1999) e Rheediafenona, recentemente identificada (DORIGUETTO et al., 2007).

**Figura 1:** Estrutura química de benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis*



**Fonte:** Santos et al. (1999)

A estrutura cristalina da guttiferona A foi determinada por difração de raios-X (MARTINS et al., 2007) e suas geometrias intra e intermoleculares foram comparadas a dois análogos de benzofenonas naturais, clusianona e epiclusianona. Já Derogis *et al.*, (2008) relataram a elucidação estrutural por IV, UV e MS, juntamente com dados espectroscópicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN das benzofenonas rheediafenona e 7-epiclusianona isoladas do pericarpo dos frutos da *Garcinia brasiliensis*. Além disso, o equilíbrio tautomérico cetona-enol na solução foi descrito para esses compostos por métodos espectrais de RMN 1D e 2D. A rheediafenona foi o primeiro representante das benzofenonas polipreniladas sem o substituinte prenil no C(5) o que causou um impacto sobre a geometria molecular. (MARTINS et al., 2008).

Em trabalho recente Santa-Cecília et al., (2012) identificaram as substâncias Guttifersona A, 7-epiclusianona, fukugetina e fukogesida, em extratos etanólicos de folhas de *Garcinia brasiliensis*.

Concomitantemente aos estudos fitoquímicos, extratos e substâncias isoladas de *Garcinia brasiliensis*, especialmente as benzofenonas, têm sido testados em diferentes sistemas biológicos visando comprovar e otimizar suas aplicações farmacológicas (SAMARÃO et al., 2010). Almeida et al., (2008) realizaram um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de frutos da *Garcinia brasiliensis* e seus compostos bioativos contra *Streptococcus mutans*. Extratos etanólico, acetato de etila e

hexânicos foram testados através de ensaios MIC/MBC. O composto bioativo identificado foi a 7-epiclusianona que mostrou uma boa atividade antimicrobiana em baixas concentrações (MIC: 1.25-2.5 µg/ml; MBC: 10-20 µg/ml).

A 7-epiclusianona também demonstrou propriedades antianafiláticas. Verificou-se sua eficácia em espasmos intestinais envolvidos com mecanismos alérgicos. Os resultados obtidos indicaram que tanto a 7-epiclusianona como a zelastina (padrão antialérgico) inibiram contrações do íleo induzidas por antígeno da cobaia com valores de IC 50 semelhantes ( $2,3 \pm 1,1$  M e  $3,3 \pm 1,2$  M, respectivamente). O mesmo bloqueio para liberação de histamina também foi observado, porém a zelastina foi mais potente que a 7-epiclusianona (IC<sub>50</sub> =  $6,3 \pm 0,2$  nM e  $3,7 \pm 0,1$  M, respectivamente) (NEVES et al., 2007).

Ainda, a 7-epiclusianona foi investigada sobre um suposto mecanismo(s) subjacente ao efeito antiespasmódico (COELHO et al., 2008). Anéis da traquéia de porcos foram montados em banhos de tecidos com solução de Krebs e a resposta contrátil a diferentes estímulos foi medida na presença e na ausência dessa benzofenona. Em conclusão, o efeito de relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas pelo composto 7-epiclusianona pareceu ser mediado pelo epitélio, óxido nítrico e mecanismos dependentes de cGMPe. Além disso, a administração oral de 7-epiclusianona reduziu episódios de obstrução brônquica.

A guttiferona A foi inicialmente descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFON et al., 1992). Trabalhos posteriores demonstraram as atividades tripanocida (ABE et al., 2004), sequestrante de radicais (NGOUEKA et al., 2006), leishmanicida *in vitro* e anticolinesterásica (LENTA et al., 2007).

Foi também investigada a inibição *in vitro* da papaína, tripsina, e catepsinas B e G por cinco tipos de benzofenonas, três compostos naturais isolados de *Rheedia brasiliensis* (Guttiferona-A, Rheediafenona e 7-Epiclusianona) e dois derivados sintéticos (2,2',4-trihidroxibenzofenona e difenilmetanona). Todas as benzofenonas naturais inibiram significativamente as quatro enzimas. A atividade da guttiferona A foi cerca de 2 - 69 vezes mais elevada do que a atividade manifestada pela epiclusianona e a rheediafenona, respectivamente. Além disso, a guttiferona se ligou preferencialmente a catepsina G, uma vez que seu valor de IC<sub>50</sub> ( $2,7 \pm 0,1$  M) sobre tais peptidases é bastante semelhante à do clássico inibidor de serina proteases, chymostatin ( $2,1 \pm 0,1$  M). Diferentemente, os derivados sintéticos 2,2',4-trihidroxibenzofenona e difenilmethanona inibiram fracamente as proteases. (MARTINS et al., 2010).

A volkensiflavona, a fukugetina e a fukogesida demonstraram significativo efeito analgésico e antiinflamatório em camundongos (RODRIGUES et al., 2005), assim como atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (VERDI et al., 2004).

### **2.3 Alelopatia**

A alelopatia é um tipo de interação bioquímica entre vegetais, considerada uma forma de adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (LOVETT; RYUNTYU, 1992). As substâncias alelopáticas podem interferir na germinação de sementes e/ou estabelecimento e desenvolvimento de indivíduos vegetais próximos, sendo, estas substâncias chamadas de aleloquímicos. Há imensa variedade de compostos com este tipo de atividade, como os ácidos orgânicos, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas, fenóis, flavonóides e taninos (CARMO et al., 2007). Devido à variedade de atuação destes compostos, os aleloquímicos são considerados como recurso para o desenvolvimento de herbicidas naturais ou de estimulantes para o crescimento de algumas plantas (BAGCHI et al., 1997).

A ação alelopática influencia a sucessão vegetal primária e secundária, a estrutura e a composição de comunidades vegetais, a dinâmica entre diferentes formações, a dominância de certas espécies vegetais (afetando a biodiversidade local) e a agricultura (CHOU, 1986; REIGOSA et al., 1999; RIZVI et al., 1992). Devido à importância que esse fenômeno apresenta em ecossistemas naturais ou manejados, os estudos sobre esse tema têm aumentado, sendo que a grande maioria dos trabalhos envolve espécies de interesse econômico (ALVES et al., 2004; CARMO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Nesse sentido, a utilização de espécies com propriedades alelopáticas assume aspectos ecológico e ambiental importantes em face da possibilidade dos aleloquímicos produzidos serem liberados para o ambiente pelas diferentes formas reconhecidas pela ciência, como lixiviação, exudação radicular, volatilização e decomposição, com isso afetando a germinação das sementes (SOUZA FILHO et al., 2005).

Geralmente, o efeito alelopático resulta da ação de vários aleloquímicos em conjunto, sendo que essas misturas podem conter substâncias similares ou de naturezas químicas diversas (EINHELLIG, 1999). Em muitos casos, os aleloquímicos dessas misturas não são

capazes de causar nenhum efeito sobre a planta-alvo quando sozinhos, uma vez que são liberados em pequenas quantidades em condições naturais (EINHELLIG, 1999; REIGOSA et al., 1999).

Entre os potenciais aleloquímicos estão os metabólitos secundários de plantas. Essas substâncias, em princípio, não apresentam nenhuma atividade considerada vital para planta, como crescimento, dispersão e reprodução estando mais relacionadas à defesa da planta contra predadores e a uma melhor adaptação ao ambiente (LI et al., 2010; NISHIDA, 2002).

Uma vez liberados no ambiente, os aleloquímicos podem causar diversos efeitos diretos e indiretos sobre as plantas (CHOU, 1986; WHITTAKER; FEENY, 1971). Os efeitos indiretos compreendem alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e, também, nas populações e/ou atividades de microrganismos, nematoides e insetos. Já os efeitos diretos incluem alterações no crescimento e metabolismo vegetal (RIZVI et al., 1982), englobando alterações em níveis celular, fito-hormonal, fotossintético, genéticos e respiratório, bem como modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas, entre outras (ANDRADE et al., 2010; RICE, 1984; RIZVIT et al., 1982)

Uma compreensão detalhada da atividade alelotóxica é crítica para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle de plantas daninhas. Segundo Prates et al., (2000) os efeitos visíveis observados em muitos estudos de alelopatia são sinais secundários de mudanças ocorridas ao nível do DNA que podem ser identificados tanto citológica quanto citogeneticamente, visto que o crescimento normal da célula vegetal depende de processos mitóticos e a divisão é um processo contínuo em regiões meristemáticas. Assim, medidas da atividade mitótica, alterações nas fases da mitose e aberrações cromossômicas são parâmetros chave através dos quais o crescimento celular pode ser avaliado (ANDRADE et al., 2008; SINGH et al., 2002).

Para avaliação da ação dos aleloquímicos é freqüente o uso de bioensaios com sementes sensíveis, entre as quais se destacam o alface e a cebola (KNOLL et al., 2006; RICE, 1984; SOARES, 2000; VARANDA, 1997). A principal vantagem do uso de *Lactuca sativa* como alvo nos estudos alelopáticos reside na rápida germinação, em aproximadamente 24 h, crescimento pouco sensível às diferenças de pH, e baixa sensibilidade a modificações no potencial osmótico do meio (ANDRADE et al., 2010; CAMPOS et al., 2008; RICE, 1984).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O estudo químico de plantas, sobretudo aquelas pertencentes à flora brasileira, constitui-se numa estratégia economicamente importante para o futuro da indústria de corantes, medicamentos e defensivos agrícolas, além de servir como direcionador do desenvolvimento sustentável do país (PINTO et al., 2002).

Com as novas necessidades da agricultura nos dias atuais o uso de herbicidas sintéticos, se tornou indispensável para se obter uma alta produtividade e livrar as lavouras de pragas e ervas daninhas. Esses herbicidas sintéticos podem causar vários efeitos danosos ao meio ambiente e também pode induzir resistência em plantas daninhas.

Os estudos de substâncias naturais com efeitos alelopáticos, vêm se tornando uma alternativa ecológica para o controle das pragas agrícolas. Com a descoberta de novos compostos o desenvolvimento de novos produtos agrícolas, que tenham uma maior eficiência e menor efeito poluente se torna cada vez mais viável.

## **4 OBJETIVO GERAL**

Determinar se os extratos de Bacupari apresentam efeito alelopático e/ou citogenotóxico no modelo vegetal alface.

### **4.1 Objetivos específicos**

Obter extratos de diferentes estruturas de Bacupari.

Avaliar o comportamento do padrão de germinação de cipcelas de *Lactuca sativa* expostas às diferentes concentrações dos extratos obtidos de Bacupari.

Identificar a ocorrência de alterações no índice mitótico e de anormalidades no ciclo celular de *L. sativa* induzidas pela exposição aos diferentes concentrações.

Determinar o padrão de sensibilidade do modelo biológico aos extratos.



## REFERÊNCIAS

- ABE, F. et al. Trypanocidal Constituents in Plants, leaves of *Rheedia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 141-143, 2004.
- ALMEIDA L.S.B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891, 2008.
- ALVES, M.C.S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- ANDRADE, L.F.; DAVIDE, L.C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 71, p. 706-710, 2008.
- ANDRADE, L.F.; DAVIDE L.C. Gedraite the effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 73, p. 621-631, 2010.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores cultivadas no sul do Brasil: Guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas**. Porto Alegre: Paisagem do Sul Porto, 2004.
- BAGCHI, G.D.; JAIN, D.C.; KUMAR, S. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1131-3, 1997.
- BRAZ FILHO, R.; MAGALHÃES, G.C.; GOTTLIEB O.R. Xantones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 3, p. 673, 1970.
- CAMPOS, J.M.S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy J.**, v. 22, p. 143-152, 2008.
- CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*). **Acta Botanica Brasílica**, v. 21, p. 697-705, 2007.
- COELHO, L.P. et al. 7 -Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 1, p. 206-214, 2008.

CORRÊA, M.P.; **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978.

CHOU, C.H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. In: PUTNAM, A.L.; TANG, C.S. *The science of allelopathy*. New York, John Wiley & Sons, p. 57-73, 1986.

CRUZ, A.J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aort. **Phytomedicine**, v. 13, 2006.

DEROGIS, P.B.M.C. et al. Complete assignment of the  $H^1$  and  $C^{13}$  NMR spectra of garcinia phenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magn. Reson. Chem.**, v. 46, p. 278-282, 2008.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G.B.M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. **J. Nat.**, v. 46, n. 5, p. 655-659, 1983.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.

DI STASE, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed., São Paulo: UNESP, p. 604, 2002.

DORIGUETTO, A.C. et al. 2,2 ,4-Trihydroxybenzophenone: crystal structure and anti-inflammatory and antioxidant activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 488-499, 2007.

DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop. Protec.**, v. 19, p. 583-589, 2000.

EINHELLIG, F.A. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, p. 479-494, 1999.

GUSTAFSON, K.R. et al. The guttiferones, HIV inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

KNOLL, M.F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, p. 539-542, 2006.

HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H. Mechanism of selective phytotoxicity of L-3,4 Dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) in barnyardgrass and lettuce. **J. Chem. Ecol.**, v. 33, p. 1919-1926, 2007.

JOLY, A.B. **Botânica – introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed., São Paulo: Editora Nacional, p. 332-334, 1993.

LENTA, B.N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v.12, p. 1548-1557, 2007.

LI, Z.H. et al. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LOVETT, J.V.; RYUNTYU, M. Allelopathy: broadening the context. **In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, p. 11-19, 1992.

MARTINS, F.T. et al. Effects of the interactions among macronutrients, plant age and photoperiod in the composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oil from Alfenas (MG), Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 123-129, 2007.

MARTINS, F.T. et al. Crystal Structure of Garciniaphenone and evidences on the relationship between Keto-Enol tautomerism and configuration. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1313-1325, 2008.

MARTINS, F.T. et al. Powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 54, n.3, p. 451-457, 2010.

NEVES, J.S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med.**, v. 73, n. 7, p. 644-649, 2007.

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Review Of Entomology**, v. 47, p. 57-92, 2002.

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, 2011.

PINTO, A.C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios E Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

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

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

RIZVI, S.G.H.; RIZVI, V. **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman and Hall, p. 480, 1982.

SANTOS, M.H. et al. Epiclusianona, a nova benzofenona tetrapenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654-60, 1999.

SAMARÃO, S.S. et al. Estudo *in vitro* da atividade do extrato etanólico de sementes de bacupari (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana) e das frações no crescimento de *Streptococcus mutans*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 2, p. 234-238, 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed., Porto Alegre: Editora da UFSC, cap. 27, p. 597-622, 2000.

SINGH, B.B. et al. Recent progress in cowpea breeding. *In*: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, p. 22-40, 2002.

SOARES, G.L.G.; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e de crescimento radicular do alface (CV. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheneaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 7, p. 180-197, 2000.

SOUZA FILHO, A.P S. **Alelopatia e as plantas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 159, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; FONSECA, M.L.; ARRUDA, M.S.P. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha**, v. 23, n. 04, p. 565-573, 2005.

VARANDA, E.A. et al. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (Paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 17, p. 85-95, 1997.

VERDI, L.G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-363, 2004.

WHITTAKER, R.W.; FEENY, P.P. Allelochemicals: chemical interactions between species. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757-769, 1971.

YAMAGUCHI, F.; SAITO, M.; ARIGA, T. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Rheedia indica* fruit rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2320–2325, 2000.

## SEGUNDA PARTE

**ARTIGO 1: Alelopatia e citogenotoxicidade de extratos foliares de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae) em bioensaio com *Lactuca sativa* L.**

**Autores:** Ênnio Miranda Barroso, Sandro Barbosa, Plínio Rodrigues dos Santos Filho, Ana Carolina de Azevedo Dias, Luiz Alberto Beijo, Marcelo Henrique dos Santos

**Artigo submetido a Revista Acta Botanica Brasilica**

**ARTIGO 2: Bioatividade de extratos obtidos de sementes e pericarpo de Bacupari sobre bioensaios com Alface.**

**Autores:** Ana Carolina de Azevedo DIAS<sup>1</sup>; Sandro BARBOSA<sup>1\*</sup>; Plínio Rodrigues dos Santos FILHO<sup>1</sup>; Ênnio Miranda BARROSO<sup>1</sup>; Luiz Alberto BEIJO<sup>1</sup>; Marcelo Henrique DOS SANTOS<sup>2</sup>.

**Artigo redigido segundo as normas da Revista Acta Amazônica**

**ARTIGO 1 - Plant growth inhibitor and cytogenotoxicity activities by leaf extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae) on bioassays with *Lactuca sativa* L.**

Ênnio Miranda Barroso<sup>a</sup>, Sandro Barbosa<sup>a\*</sup>, Plinio Rodrigues dos Santos Filho<sup>b</sup>, Ana Carolina de Azevedo Dias<sup>a</sup>, Luiz Alberto Beijo<sup>c</sup>, Marcelo Henrique dos Santos<sup>d</sup>

---

<sup>a</sup>Federal University of Alfenas, Institute of Nature Sciences.

<sup>b</sup>Federal University of Alfenas, Institute of Exact Sciences.

<sup>c</sup>Federal University of Viçosa, Institute of Biomedical Sciences.

<sup>d</sup>Federal University of Viçosa, Department of Chemistry.

Author for correspondence: *sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br*

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the phytotoxicity and cytogenotoxicity activities by the Aqueous (AEB) and Ethanolic (EEB) extracts from Bacupari leaves on bioassays with *Lactuca sativa* L. Both AEB and EEB delayed the germination in a concentration dependent manner at 24h and 48h after sowing. After 72 hours, there was no difference in relation to control. Root elongation and fresh and dry biomasses were also influenced by concentration level, however, the AEB was more effective than the EEB. Cytogenetic analysis of meristematic cells from the root tips of *Lactuca sativa* L. showed that EEB presents cytotoxic effect inhibiting the mitotic index but does not lead to the occurrence of chromosomal abnormalities. The AEB presents cytotoxic and genotoxic effects, since it inhibits cell division and also leads to the occurrence of chromosomal abnormalities such as C-metaphases, *stickiness*, chromosomal bridges and lost chromosomes. Partial characterization of extracts pointed to the presence of inhibiting chemical substances, such as phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins which may contribute to the phytotoxic action. In conclusion, both extracts affected germination, root elongation and mitotic index; however, the aqueous extract was more efficient. Moreover, the aqueous extract led to the occurrence of chromosomal abnormalities.

**Key words:** Bacupari, chromosomal abnormalities, mitotic index, phytotoxicity.

## Introduction

The extensive use of synthetic herbicides has caused serious environmental problems. Besides polluting soil, air and water, it leads to a selection of gradually more resistant individuals (Gelmini *et al.* 2001). As a response, researchers have searched for alternative strategies for handling with weeds and dependence on synthetic herbicides. For this purpose, the use of plants with phytotoxicity properties has presented promising results (Inoue *et al.* 2010; Souza Filho *et al.* 2010, Reigosa *et al.* 2013).

In nature, many natural compounds have phytotoxicity properties. These chemicals include mainly secondary metabolites, such as phenolic compounds and flavonoids among others (Macias *et al.* 2007; Dayan *et al.* 2009). These substances may interfere in germination and/or in the establishment and development of close plant individuals and are known as allelochemicals. In this sense, a broad understanding of the phytotoxic activity is essential for the development of new tools to control weeds. From this point of view Prates *et al.* (2000) mention that the visible effects observed in many allelopathy studies are secondary signs of



alterations in the DNA which can be identified both cytologically and cytogenetically, since the normal growth of the plant cell depends on mitotic processes and the division is a continuous process in meristematic regions. Thus, measurements of the mitotic activity, alterations in the mitotic phases and chromosomal abnormalities are key parameters by means of which cell growth can be assessed (Singh *et al.* 2002; Andrade *et al.* 2008).

*Garcinia brasiliensis* Mart., known as Bacupari, is a species native to the Amazon region, but today found all over the Brazilian territory. In traditional medicine this plant is used in the treatment of the urinary tract, arthritis and to relieve pain (Corrêa, 1978; Lorenzi, 2008). Pharmacological studies with *Garcinia brasiliensis* extracts and isolated substances have shown different biological applications, as follows: antimicrobial (Almeida *et al.* 2008; Murata *et al.* 2008; Naldoni *et al.* 2009), leishmanicidal (Pereira *et al.* 2010), antispasmodic (Coelho *et al.* 2008), anti-inflammatory and antioxidant (Martins *et al.* 2008; Santa-Cecília *et al.* 2011), antiproliferative (Murata *et al.* 2010) and antianaphylactic activities (Neves *et al.* 2007), evidencing the relevance of this species. Also, leaf pharmacobotanical characterization of this plant has recently been carried out (Santa-Cecília *et al.* 2013).

Plant bioassays have been widely used in phytotoxicity studies of environmental samples (Pereira *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2013) and of biological effect by plant extracts (Ribeiro *et al.* 2012). One of the most used bioassays is that of *Lactuca sativa* due to its susceptibility to chemical agents, fast germination, linear growth and wide range of pH variations, low susceptibility to osmotic potentials (Araújo & Monteiro 2005; Simões *et al.* 2013), and low cost.

Although the effect of Bacupari fresh leaves infusion on germination of *L. sativa* were carried out by Oliveira *et al.* (2011), the phytotoxic aspects of the species as well as its cytogenotoxic activity are still to be detailed. Thus, the aim of this work was to evaluate the phytotoxic and the cytogenotoxic activities by Bacupari leaf extracts in *Lactuca sativa* L. bioassay.

## **Material and methods**

### *Plant material and extracts preparation*

Bacupari leaves were collected in February 2011, from a population situated at the campus of the Federal University of Viçosa-MG, Brazil (latitude 20° 45' 14" South and longitude 42° 52' 55" West) where the voucher specimen is deposited in the local herbarium under registration number VIC2604. The leaves were air-dried at 40 °C and powdered. The aqueous extract

(EAB) was obtained by infusion of 200 gr of leaves in distilled water at 90 °C for 30 minutes. After cooling at room temperature, the infusion was filtered and lyophilized. The ethanolic extract (EEB) was obtained by percolation in ethanol P.A. until plant exhaustion. The obtained extract was concentrated under reduced pressure. Stock solutions of EAB and EEB in concentrations of 1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mg/mL were prepared, respectively, in water and ethanol P.A. The extracts were evaluated as for pH, by using a digital pHmeter (Tecnonon mPA 210), and for osmotic potential, by using an automatic osmometer (Advanced Instruments - 3320 Micro-Osmometer).

### *Biossay*

*Lactuca sativa* L cv Grand Rapids' were used in the experiments. Three replicates of 30 seeds were randomly distributed in Petri dishes lined with Whatman n°2 filter paper, moistened with 3mL of a solution containing different concentrations (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mg/mL) of each extract, and in the case of the control 3 mL of distilled water following methodology standardized by Simões *et al.* (2013). For EEB, Petri dishes were kept open for ethanol evaporation and water was added later (Mazzafera 2003). The experiments were plotted in BOD germination chamber, at 20°C and 12-hours photo period. Germination was evaluated 24, 48 and 72 hours after swelling, by counting seeds with radicle protrusion. The root elongation was obtained by measuring the 10 longest roots 96 hours after sowing. These plants were then weighed to determine fresh biomass and next they were left for 72h at 105°C to determine dry biomass.

### *Cytogenetic analyses*

Root tips of *Lactuca sativa* L. were collected 24 hours after exposure to each treatment as described above. Then, the roots were fixed in Carnoy solution (ethanol: acetic acid 3:1 v/v) for 24 hours, washed twice in distilled water, hydrolyzed in HCl 5M for 20 minutes at room temperature, washed once again and stained with Schiff reagent for 45 minutes (in darkness). After that, the meristem was collected, a drop of acetic acid at 45% was added and the glass slide was prepared by the squash method, in accordance with Ribeiro *et al.* (2012). Determination of the mitotic index (MI) and of the chromosomal abnormalities (CA) was carried out in accordance with equation proposed by Rodrigues *et al.* (2013) with modifications.

### *Determination of phenolic, flavonoid and proanthocyanidins content*

Total phenolic content was determined as described by Gillespie & Ainsworth (2007) with minor modifications. Briefly, 0.1 mL of the extracts were mixed with 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent diluted in water (1:10). After 8 minutes, 0.4 mL of 4% sodium carbonate were added. The samples were incubated for two hours in the dark and the absorbance was measured at 740 nm. Quantification was based on a standard curve of gallic acid.

Total flavonoid content was measured according to Park *et al.* (1997). Aliquots of 0.5 mL of the extracts were mixed with 1.5 mL of methanol, 0.1 mL of 10% aluminum chloride, 0.1 mL of potassium acetate and 2.8 mL of distilled water. They were then incubated for 30 minutes at room temperature and the absorbance was measured at 415 nm. Quantification was based on a standard curve of quercetin.

The proanthocyanidins were determined photometrically after acid depolymerization to the corresponding anthocyanidins as described by (Rösch *et al.* 2003). In fact, 1 mL of the extracts was added to 9 mL of a solution of concentrated hydrochloric acid in n-butanol (10:90, v/v). The closed vial containing the solution was mixed vigorously and heated for 90 min in a boiling water bath. After the solution was cooled to room temperature, the absorbance at 550 nm was measured. The content of proanthocyanidins was calculated by the molar extinction coefficient of cyanidin  $\epsilon = 17360 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

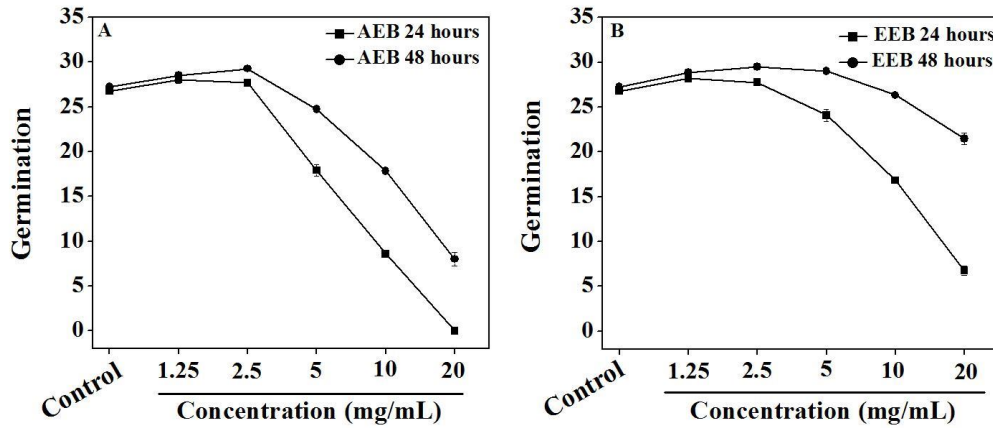
### *Statistical Analyses*

Data were subjected to ANAVA and the means were compared by using linear regression or Scott-Knott test at 5% significance.

## **Results and discussion**

The effect of Bacupari leaf extracts on *Lactuca sativa* germination is shown in Figure 1. Both (AEB) and (EEB) delayed the germination, in a concentration dependent manner 24h and 48h after sowing. After 72h there was no difference when compared to control. These data confirm those obtained by Oliveira *et al.* (2011) who also observed delay in germination of *Lactuca sativa* exposed to the extracts from fresh Bacupari leaf. This delay is coherent since germination is less susceptible to allelochemicals and many times the allelopathic effect is not on germinability but on the speed of germination (Labourau 1983; Ferreira *et al.* 2000). It is

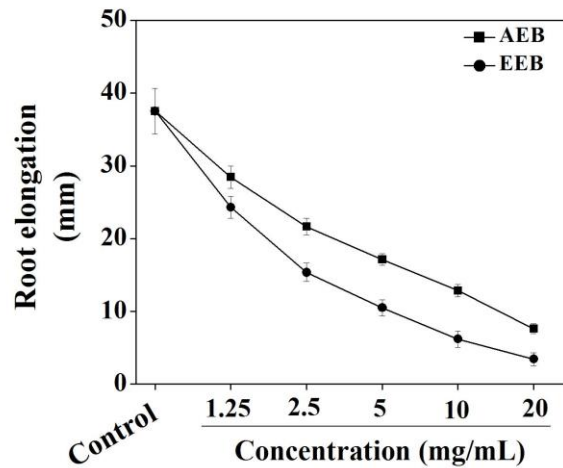
important to point out that the concentrations used in this work were low when compared to those observed in previous works which used concentrations of over 50mg/mL (Mazzafera 2003; Teerarak 2010).



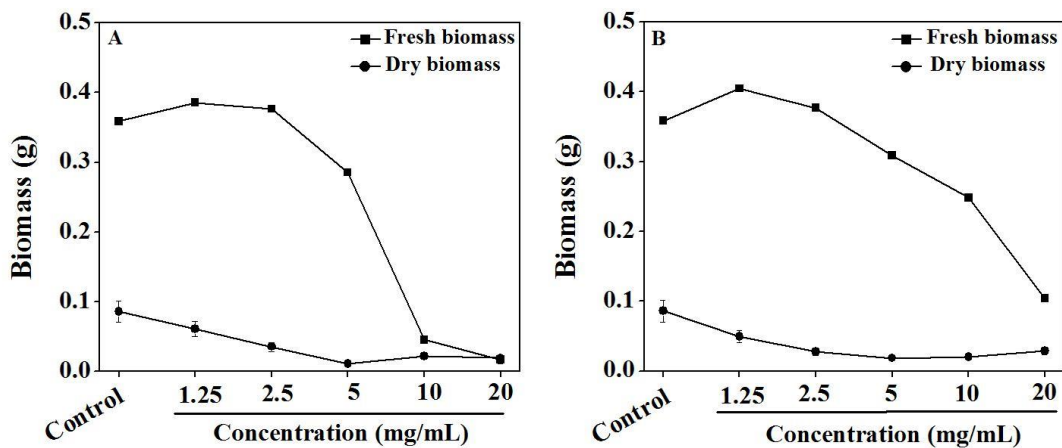
**Figure 1:** Germination of *L. sativa* plants under different concentrations of Bacupari aqueous (A) and ethanolic (B) extracts. **A:**  $y = -8.2299 + 1.1917x - 0.0105x^2$ ,  $R^2 = 93.22\%$ ; **B:**  $y = -10.0879 + 1.5221x - 0.0140x^2$ ,  $R^2 = 91.96\%$ .

Contrary to germination, initial growth of plants is, in general, much more susceptible to allelochemical substances (Ferreira et al., 2000). In this sense, both (AEB) and (EEB) have inhibited root elongation of *Lactuca sativa* in a concentration dependent manner, in accordance with the adjusted regression model (Figure 2). However, the statistical comparison of extracts showed that AEB was more efficient in all concentration analyzed. These results show that root elongation was more susceptible to phytotoxic potential of extracts than the germination, confirming those obtained by Tigre *et al.* (2012) and Fonseca *et al.* (2012).

Concerning fresh and dry biomasses, the effect of the extracts was also associated to concentration level (Figure 3). Extracts behavior was similar to control in the lower concentrations, but the AEB was more efficient than the EEB at the concentrations of 10 and 20 mg/mL. In fact, in these concentrations, fresh biomass was similar to dry biomass for AEB, evidencing plant deficient development. It is important to point out that pH and osmotic potential of extracts were assessed (data not showed) and it was observed they were in a range that does not mask the phytotoxic effect.



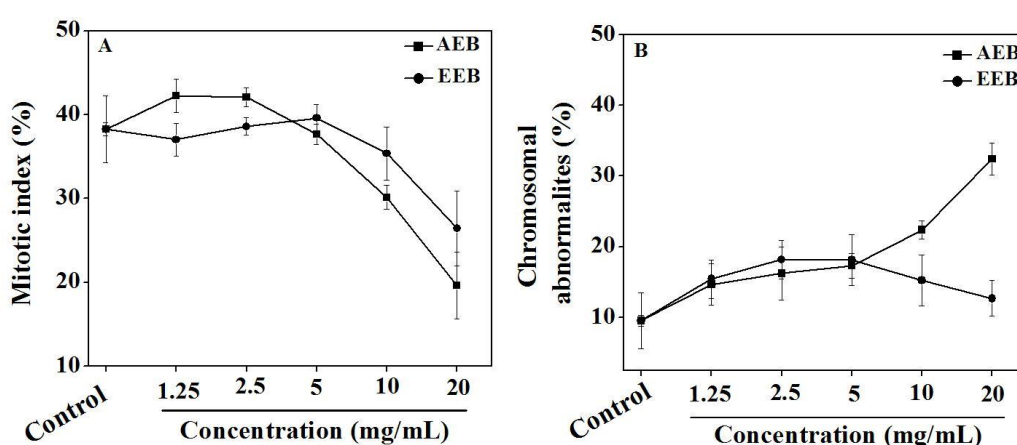
**Figure 2:** Root elongation of *L. sativa* plants under different concentrations of Bacupari aqueous (AEB) and ethanolic (EEB) extracts. AEB:  $y = 30.2228 - 4.5538x + 0.1626x^2$ ,  $R^2 = 85.80\%$ ; EEB:  $y = 32.6960 - 3.2815x + 0.1032x^2$ ,  $R^2 = 88.43\%$ .



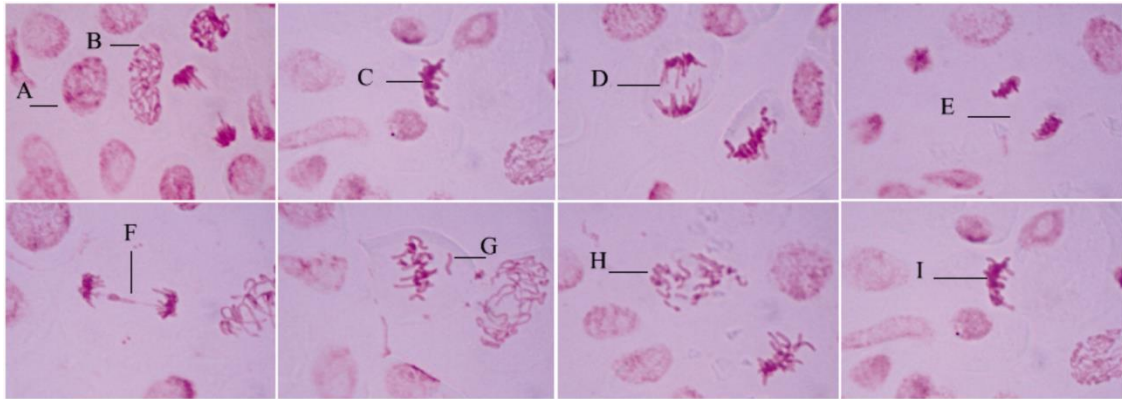
**Figure 3:** Fresh and dry biomasses of *L. sativa* plants under different concentrations of Bacupari aqueous (A) and ethanolic (B) extracts. Fresh biomass: **A:** Fresh biomass  $y = 0.4360 - 0.0454x + 0.0012x^2$ ,  $R^2 = 93.22\%$ ; Dry biomass  $y = 0.0238 - 0.0014x + 0.00002x^2$ ,  $R^2 = 86.75\%$ ; **B:** Fresh biomass  $y = 0.3770 - 0.0098x - 0.0001x^2$ ,  $R^2 = 92.23\%$ ; Dry biomass  $y = 0.0209 + 0.0004x - 0.00005x^2$ ,  $R^2 = 94.43\%$ .

The effect of Bacupari extracts on the mitotic index (MI) and the occurrence of chromosomal abnormalities (CA) is shown in Figures 4 and 5. Both AEB and EEB reduced the percentage of cells in division in concentrations of 10 and 20 mg/mL ( $P < 0.05$ ). In other concentrations there was no difference in relation to control ( $p > 0.05$ ). From this result it is possible to infer that, in these concentrations, at least part of the action mechanism of the extracts consists of inhibiting cell division. In fact, the mitotic index represents an important parameter for studies on cytotoxicity mechanisms (Leme & Marin-Morales 2009). The tip of the growing root consists of meristematic and elongating regions, the latter being larger than the previous (Ivanov 1997), so that the tissue growth occurs by increasing the number and volume of cells. Thus, at concentrations where no decrease in MI was observed is possible that there has been interference in cell elongation, once the root elongation was affected. In this sense, Robertson *et al.* (1990) observed serious inhibition of cell elongation without alteration in the mitotic index while studying the answer of sunflower primary root to hydric deficit.

Still on this aspect, Figure 4B shows the general occurrence of CA in the different treatments. In 10 and 20 mg/mL concentrations, AEB increased the occurrence of CA in relation to control ( $p < 0.05$ ), which is related to the MI reduction. In the case of EEB there was no difference in the occurrence of abnormalities even in concentrations where there was MI reduction. Thus, the EEB can be considered cytotoxic, whereas AEB can be considered cytogenotoxic.



**Figure 4:** Mitotic Index (A) and chromosomal abnormalities (B) of *L. sativa* roots under different concentrations of Bacupari aqueous (AEB) and ethanolic (EEB) extracts. **A:** LAE  $y = 42.4813 - 0.5792x - 0.0287x^2$ ,  $R^2 = 90.01\%$ ; LEE  $y = 36.6519 + 0.9241x - 0.0724x^2$ ,  $R^2 = 78.16\%$ ; **B:** LAE  $y = 13.1321 + 0.5558x + 0.0200x^2$ ,  $R^2 = 88.32\%$ .



**Figure 5: Cell Division.** A. Interphase. B. Prophase. C. Metaphase. D. Anaphase. E. Telophase. **Chromosomal abnormalities.** F. Chromosomal Bridge. G. Lost chromosome. H. C-Metaphase. I. *Stickiness*.

Relative frequencies of each abnormality observed in the root of *Latuca sativa* are presented in Table 1. The presence of chromosomal bridges indicates clastogenic effect, whereas lost chromosomes, stickiness and C-metaphase result from aneugenic effects (Leme & Marin-Morales 2009). These irregularities in the chromosomal complement indicate that the AEB toxicity may be related to structural alterations in chromatin as well as on chromosomal segregation (Fiskisjo 1988, 1997).

**Table 1:** Relative frequency of chromosomal abnormalities (%) observed in *L. sativa* in roots at five different concentrations of Bacupari aqueous (AEB) and ethanolic (EEB) extracts.

Extract	Concentration (mg/mL)	Relative frequency of chromosomal abnormalities (%)			
		CM	BRIDGE	LC	STICKINESS
<b>AEB</b>	Control	2.8 ± 0.33	3.5 ± 0.46	0.3 ± 0.26	2.7 ± 0.38
	1.25	3.3 ± 0.37	7.8 ± 1.08	0.5 ± 0.25	3.9 ± 0.24
	2.5	3.8 ± 0.23	8.7 ± 0.88	0.5 ± 0.25	3.7 ± 0.30
	5	4.1 ± 0.42	5.6 ± 1.07	0.6 ± 0.25	3.5 ± 0.61
	10	4.8 ± 0.46	8.4 ± 1.62	0.6 ± 0.24	6.5 ± 0.71
	20	8.9 ± 1.40	6.9 ± 1.15	1.6 ± 0.42	14.2 ± 2.26
<b>EEB</b>	1.25	4.2 ± 0.41	5.4 ± 1.78	0.6 ± 0.35	5.0 ± 0.83
	2.5	3.3 ± 0.80	10.4 ± 0.96	1.5 ± 0.80	5.5 ± 0.27
	5	2.0 ± 0.60	11.4 ± 1.6	0.3 ± 0.13	2.6 ± 0.7
	10	3.0 ± 0.70	5.9 ± 1.16	1.1 ± 0.65	4.1 ± 0.78
	20	2.5 ± 0.47	5.3 ± 1.52	0 ± 0	4.8 ± 0.62

<sup>1</sup>CM = C-metaphase; <sup>2</sup>BRIDGE = Chromosomal bridge; <sup>3</sup>LC = Lost chromosome; <sup>4</sup>STICK = Stickiness.

It has been evidenced by phytochemical studies that *Garcinia brasiliensis* presents large diversity of secondary metabolites such as benzophenones, phenolic compounds and flavonoids, to which different biological activities have been credited (Santa-Cecília *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2010; Santos *et al.* 1999). Thus, Table 2 shows the total content of phenolic, flavonoids and proanthocyanidins in Bacupari extracts. It is observed that phenolic compounds concentration was similar between extracts, though flavonoids concentration was larger in EEB while the concentration of proanthocyanidins was larger in the AEB. Phenolic compounds are considered important allelochemicals (Li *et al.* 2010). Besides, Ribeiro *et al.* 2012 observed higher phytotoxic action associated with the presence of phenolics and flavonoids, but not of proanthocyanidins. Thus, the phytotoxic action of Bacupari extracts can be, at least in part, ascribed to the presence of these metabolites. However, the differences observed between AEB and EEB do not seem directly related to these data, since AEB, despite presenting more phytotoxicity, has similar or lower levels of metabolites than EEB. For this reason, future work with fractions and isolated substances could contribute to the explanation of which compounds are responsible for these activities, as well as to clarify if there are synergistic or antagonist actions among those compounds.

**Table 2:** Total content of phenolics, flavonoids and Proanthocyanidins. AEB: Aqueous extract of Bacupari; EEB: Ethanolic extract of Bacupari.

Extract	Phenolics (mg/g of extract)	Flavonoids (mg/g of extract)	Proanthocyanidins (mM/g of extract)
<b>AEB</b>	135.46±0.95	51.33±1.46	23.07±1.12
<b>EEB</b>	132.85±0.39	123.33±2.47	18.33±1.25

In conclusion, the results allow us to show that Bacupari leaf extracts present phytotoxic and cytogenotoxic potential. Both extracts affected germination, root elongation and the mitotic index. The aqueous extract was more efficient, though. In addition, the aqueous extract induced the occurrence of chromosomal abnormalities.

### Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant AUX PE–PNPD-2297.2011)



## References

- Almeida, L.S.B.; Murata, R.M.; Yatsuda, R.; Santos, M.H.; Nagem, T.J.; Alencar, S.M.; Koo, H. & Rosalen, P. L. 2008. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine** **15**: 886-891, 2008.
- Andrade, L.F.; Campos & Davide, L.C. 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays **Ecotoxicology and Environmental Safety**. **71**: 706-710.
- Araújo, A.S.F. & Monteiro, R.T.R. 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**. **62(3)**: 286-290.
- Coelho, L.P.; Serra, M.F.; Pires, A.L.; Cordeiro, R.S.; Rodrigues, P.M.; Santos, M.H. & Martins, M.A. 2008. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. **1**: 206-214.
- Corrêa, M.P. 1978. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.
- Corrêa M.F.P.; Melo, G.O. & Costa, S.S. 2008. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Revista Brasileira Farmacognosia** **18**: 785-797.
- Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. **12**: 175-204.
- Fonseca, L.; Mezzalira, J.C. & Bremm, C. 2012. Management targets for maximising the short-term herbage intake rate of cattle grazing in *Sorghum bicolor*. **Livestock Science** **145**: 205-211.
- Fiskesjo, G. 1988. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research** **197**: 243–260.
- Fiskesjo, G. 1997. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wang, W.; Gorsuch, J.W. & Hughes, J.S. (Eds) **Plants for Environmental Studies**. New York, Lewis Publishers.
- Gelmini, G.A.; Filho, V.; Novo, R.S. & Salvo, M.C. 2001. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**. **60**: 93-99.
- Ainsworth, E.A. & Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols** **2**: 867–870.

- Inoue, M.H.; Santana, D.C.; Souza Filho, A.P.S.; Possamai, A.C.S.; Silva, L.E.; Pereira, M.J.B.; Pereira, K.M. 2010. Potencial alelopático de *annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha** **28**: 489-498.
- Ivanov V.A. 1997. *Echinobothrium notoguidoi* n. sp. (Cestoda: *Diphyllidea*) from *Mustelus schmitti* (Chondrichthyes: *Carcharhiniformes*) in the Argentine Sea. **Journal of Parasitology** **83**: 913-916.
- 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. 2008. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo, Nova Odessa.
- Martins, F.T.; Camps, I.; Doriguetto, A.C.; Dos Santos, M.H.; Ellena, J. & Barbosa, L.C.A. 2008. Crystal Structure of Garciniaphenone and evidences on the relationship between Keto-Enol tautomerism and configuration. **Helvetica Chimica Acta** **91**: 1313-1325.
- Mazzafera, P. 2003. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica** **26**: 231-238.
- Murata, R.M.; Almeida, L.S.B; Yatsuda, R.; Dos Santos, M. H.; Nagem, T.J.; Rosalen, P. L. & Koo, H. 2008. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Microbiology Letters** **282**: 174-181.
- Murata, R.M.; Yatsuda, R.; Dos Santos, M. H.; Kohn, L.K.; Martins, F.T.; Nagem, T.J.; Alencar, S.M.; De Carvalho, J.E. & Rosalen, P.L. 2010. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytotherapy Research** **24**: 379-383.
- Naldoni, F.J.; Claudino, A.L.; Cruz, J.W.JR; Chavasco, J.K.; Faria E Silva, P.M.; Veloso, M.P. & Dos Santos, M.H. 2009. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food** **12**: 403-407.
- Neves, J.S.; Coelho, L.P.; Cordeiro, R.S.; Veloso, M.P.; Silva, P.M.R.; Dos Santos, M.H. & Martins, M.A. 2007. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica** **73**: 644-649.
- Oliveira, A.K.M.; Ribeiro, J.W.F.; Matias, R.; Gusmão, D.H. & Pereira, K.C.L. 2011. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari [*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana] na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**. **9**: 550-553.
- Park, Y.K; Koo, M.H.; Ikegaki, M. & Contado, J.L. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de biologia e tecnologia** **40**: 97-106.

- Pereira, I.O.; Marques, M.J.; Pavan, A.L.; Codonho, B.S.; Barbiéri, C.L.; Beijo, L.A.; Doriguetto A.C.; D'martin, E.C. & Dos Santos, M.H. 2010. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine** **17**: 339-345.
- Pereira, M.P.; Pereira, F.J.; Rodrigues, L.C.A.; Barbosa, S. & De Castro, E.M. 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular **Revista Agroambiente** **7**: 36-43.
- Prates, H.T.; Paes, J.M.V.; Pires, N.M.; Pereira Filho, I.A. & Magalhães, P.C. 2000. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **35**: 909-914.
- Rodrigues, L.C.A.; Barbosa, S.; Silva, M.P.; Maselli, B.S.; Beijo, L.A. & Kummrow, F. 2013. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** **17**: 1099-1108.
- Ribeiro, L.O.; Barbosa, S.; Balieiro, F.P.; Beijo, L.A.; Santos, B.R.; Gouvea, C.M.C.P. & Paiva, L.V. 2012. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências** **10**: 220-225.
- Reigosa, M.; Gomes, A.S.; Ferreira, A.G.; Borghetti, F. 2013. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica** **27**: 629-646.
- Santa-Cecília, F.V.; Vilela, F.C.; Da Rocha, C.Q.; Dias, D.F.; Cavalcante, G.P.; Freitas, L.A.; Dos Santos, M.H. & Giusti-Paiva, A. 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology** **133**: 467-473.
- Santa-Cecília, F.V.; Abreu, F.A.; Da Silva, M.A.; De Castro, E.M. & Dos Santos, M.H. 2013. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart.(Clusiaceae). **Rev. bras. plantas med** **15**: 397-404.
- Souza Filho, A.P.S. & Mourão, JR.M. 2010. Padrão de resposta de mimosa pudica e senna obtusifolia à atividade potencialmente alelopática de espécies de poaceae. **Planta Daninha** **28**: 927-938.
- Simões, M.S.; Mandail, R.H.; Barbosa, S. & Nogueira, M.L. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas** **26**: 29-36.
- Singh, B.B.; Ehlers, J.D.; Sharma, B. & Freire Filho, F.R. 2002. Recent progress in cowpea breeding. In: Fatokun, C.A.; Tarawali, S.A.; Singh, B.B.; Kormawa, P.M. & Tamò, M

(Eds). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production.**

Ibadan, Iita.

- Teerarak, M.; Laosinwattana, C. & Charoenying, P. 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology** **101**: 5677–5684.
- Tigre, R.C.; Silva, N.H.; Santos, M.G.; Honda, N.K.; Falção, 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.
- Li, Z.H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C.D. & Jiang, D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules** **15**: 8933–8952.
- Pereira, I.O.; Marques, M.J.; Pavan, A.L.; Codonho, B.S.; Barbiéri, C.L.; Beijo, L.A.; Doriguetto, A.C.; D’Martin, E.C. & dos Santos, M.H. 2010. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine** **17**: 339–345.
- Macias, F.A.; Molinillo, J.M.G.; Varela, R.M. & Galindo, J.C.J. 2007. Allelopathy: a natural alternative for weed control. **Pest Management Science** **63**: 327–348.
- Dayan, F.E.; Cantrell, C.L. & Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **17**: 4022–4034.

**ARTIGO 2: Bioatividade de extratos obtidos de sementes e pericarpo de Bacupari sobre bioensaios com Alface.**

**Autores:** Ana Carolina de Azevedo DIAS<sup>1</sup>; Sandro BARBOSA<sup>1\*</sup>; Plínio Rodrigues dos Santos FILHO<sup>1</sup>; Ênnio Miranda BARROSO<sup>1</sup>; Luiz Alberto BEIJO<sup>1</sup>; Marcelo Henrique DOS SANTOS<sup>2</sup>.

**Artigo redigido segundo as normas da Revista Acta Amazônica**

## **BIOATIVIDADE DE EXTRATOS OBTIDOS DE SEMENTES E PERICARPOS DE BACUPARI SOBRE BIOENSAIOS COM ALFACE.**

**Autores:** Ana Carolina de Azevedo DIAS<sup>1</sup>; Sandro BARBOSA<sup>1\*</sup>; Plínio Rodrigues dos Santos FILHO<sup>1</sup>; Ênnio Miranda BARROSO<sup>1</sup>; Luiz Alberto BEIJO<sup>1</sup>; Marcelo Henrique DOS SANTOS<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas/MG

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa/MG

\* Autor correspondente: sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br

### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi averiguar os efeitos de extratos da pericarpo e sementes de Bacupari em bioensaios utilizando Alface (*Lactuca sativa* L.) como planta-alvo, buscando compreender a ação dos aleloquímicos e ampliar o conjunto de informações sobre a ação fitotóxica de extratos dessa planta. Os biotestes com sipselas de Alface foram conduzidos em câmara de germinação tipo B.O.D, a  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo 12 h durante 96 h, com etanólico do pericarpo e de sementes em diferentes concentrações, sendo utilizado como controle água destilada. Os testes de germinabilidade (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM) foram feitos com quatro repetições de 30 sipselas de Alface cada uma expostas aos diferentes tratamentos. As pontas de raiz foram coletadas, fixadas em Carnoy e armazenadas até a confecção das preparações citológicas onde foram contadas 3000 células por tratamento para avaliação do índice mitótico (IM), além da avaliação de anormalidades cromossômicas. Um segundo experimento foi conduzido utilizando os mesmos tratamentos visando analisar a fitotoxicidade do Bacupari tomando como variáveis o comprimento de 10 raízes de cada repetição e a biomassa fresca e seca das plântulas obtidas após 96 horas de cultivo. O resultado obtido para o extrato de pericarpo de Bacupari, na maioria das análises, apresentou um efeito redutor dependente da concentração, exercendo uma ação fitotóxica e citotóxica sobre o bioensaio. Contudo, o mesmo não foi observado para os dados de semente, que atuaram apenas na inibição do crescimento inicial e do índice mitótico, caracterizando uma ação citotóxica dos compostos bioativos presentes neste extrato.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitotoxicidade, *Garcinia Brasiliensis*, *Lactuca sativa* L.

## INTRODUÇÃO

*Garcinia brasiliensis* Mart. é uma espécie nativa da flora Amazônica conhecida popularmente como Bacupari, Bacuripari, Porocó, entre outros. Atualmente é encontrada em todo o território brasileiro, no Paraguai e norte da Argentina. Tem sido utilizada na medicina popular como agente cicatrizante e no tratamento de úlceras pépticas e tumores (LORENZI, 2008). Pertence a família Clusiaceae (JOLY, 2002) e é considerada a espécie mais conhecida do gênero *Garcinia* (MORTON, 1987).

O bacuparizeiro é uma árvore pirâmidal rica em látex de coloração amarelada. Possui folhas lanceoladas, flores abundantes e polígamas e frutos comestíveis (POTT et al., 2004), ovais com a casca (pericarpo) elástica e amarela que pode ser facilmente removida (MORTON, 1987; LORENZI, 2008). Os frutos apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, bem visíveis longitudinalmente, semelhantes a nervuras. Internamente, são de coloração branco-amarelada e exsudam o látex amarelado (DO NASCIMENTO et al., 2002).

A heterogeneidade química presente nessas plantas tornou-as uma das principais fontes de isolamento de compostos orgânicos bioativos (FRUTUOSO, et al., 2007). Em *Garcinia brasiliensis* foram relatadas a presença de benzofenonas polipreniladas, xantonas e flavonóides (DOS SANTOS et al., 1999; RUBIO et al., 2001). Essas substâncias são oriundas do metabolismo secundário que (WALLER, 1999), além de desempenharem funções fisiológicas, podem participar de interações entre plantas atuando como aleloquímicos. Essas interações são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais. (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Bioensaios vegetais têm sido amplamente utilizados em estudos de fitotoxicidade de amostras ambientais (PEREIRA et al. 2013; RODRIGUES et al. 2013) e do efeito biológico de extratos vegetais (RIBEIRO et al. 2012). Um dos bioensaios mais utilizados é o *Lactuca sativa* devido sua sensibilidade a agentes químicos, rápida germinação, crescimento linear em ampla faixa de variação de pH, baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005; SIMÕES et al. 2013) e baixo custo.

Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar se os extratos obtidos do pericarpo e sementes de *Garcinia brasiliensis* apresentam efeito fitotóxico e/ou citotóxico em bioensaios com *Lactuca sativa* L.

## MATERIAS E MÉTODOS

### Obtenção dos extratos

Frutos de Bacupari foram coletados de uma população localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV/Viçosa-MG), onde já se encontra um espécime depositado em herbário com o código VIC2604. A polpa, a casca e a semente foram separadas, secas em estufa a 40°C e trituradas.

Os extratos etanólicos foram obtidos por percolação do material vegetal em etanol P.A até o esgotamento da planta. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a 40°C e liofilizados. Para cada extrato foram atribuídas seis concentrações (1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20 mg/mL) a partir de uma solução estoque.

### Bioensaio

Cipselas de Alface (*Lactuca sativa* L.) do cultivar Grand Rapids foram utilizadas no experimento por apresentar maior precocidade nos testes preliminares de germinação, sendo, portanto, definida como planta-alvo.

Para os testes de germinação, quatro repetições de 30 cipselas foram distribuídas em placas de Petri (6 cm de diâmetro) forradas com papel filtro e umedecidas com 3 mL da solução em diferentes concentrações para cada de extrato (1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20 mg/mL), no caso do grupo controle, com 3 mL de água destilada. Para a evaporação dos extratos, as placas foram mantidas abertas por 24 horas, sendo posteriormente adicionada água destilada (Mazzafera, 2003). Os bioensaios foram conduzidos em câmara de germinação tipo BOD (411FDP, Ethik) com temperatura controlada de 25°C e sob fotoperíodo 12/12 horas luz/escuro, de acordo com a metodologia padronizada por Simões et al.(2013). Foram utilizadas quatro repetições de 30 cipselas para cada concentração dos extratos de substâncias isoladas e do controle, com delineamento estatístico inteiramente casualizados.

Para o teste de verificação de fitotoxicidade, foram realizadas observações a cada 12 horas até completar 96 horas de embebição anotando-se o número de sipselas germinadas em cada tratamento para o cálculo da Germinabilidade e do Índice de Velocidade de Germinação. Após 96 horas de cultivo, as mesmas plântulas foram pesadas em balança analítica (AY220,



Marte, S.R.S, Brasil) para determinação da biomassa fresca, e em seguida mantidas em estufa (Q317M32, Quimis, Diadema, Brasil) a 50°C por 24 horas para obtenção da biomassa seca. O alongamento de raiz foi aferido simultaneamente a pesagem de biomassa fresca, obtido pela medição das 10 maiores raízes de cada placa, com auxílio do paquímetro.

### **Alterações citogenéticas**

Um segundo experimento foi conduzido utilizando os mesmos tratamentos supradescritos, visando avaliar a citotoxicidade dos extratos de Bacupari.

As sementes consideradas germinadas (com protrusão da radícula) foram coletadas após 24 horas de exposição a cada tratamento, fixadas em Carnoy (álcool etílico e ácido acético 3:1 v/v) e armazenadas em freezer a - 4°C. As lâminas para análise citogenética foram confeccionadas pelo método de esmagamento adaptado de Guerra e Souza (2002) e Barbosa et al. (2003). Após a fixação, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida lavadas novamente e coradas com Reativo de Schiff, permanecendo por 2 horas em câmara escura. Posteriormente, as pontas de raiz foram transferidas para as lâminas, extraindo apenas a zona meristemática. Foi adicionada uma gota de ácido acético 45% sobre o material e colocada a lamínula. Feito isso, a lâmina foi levada a nitrogênio líquido por 1 minuto e então a lamínula foi retirada, estando pronta para ser analisada. As avaliações citogenéticas foram feitas pela observação das etapas do ciclo celular, para determinação do índice mitótico pela equação proposta por Rodrigues et al. (2013), e das anormalidades cromossômicas. Foram analisadas em microscópio óptico (Model Elipse E200, Nikon, Japão) 3000 células para cada tratamento e as anormalidades foram avaliadas somente a nível qualitativo.

### **Análise estatística**

Cada um dos extratos constituiu um experimento, sendo todos conduzidos da mesma forma. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos, que correspondem às seis concentrações do extrato e ao controle, e quatro repetições.

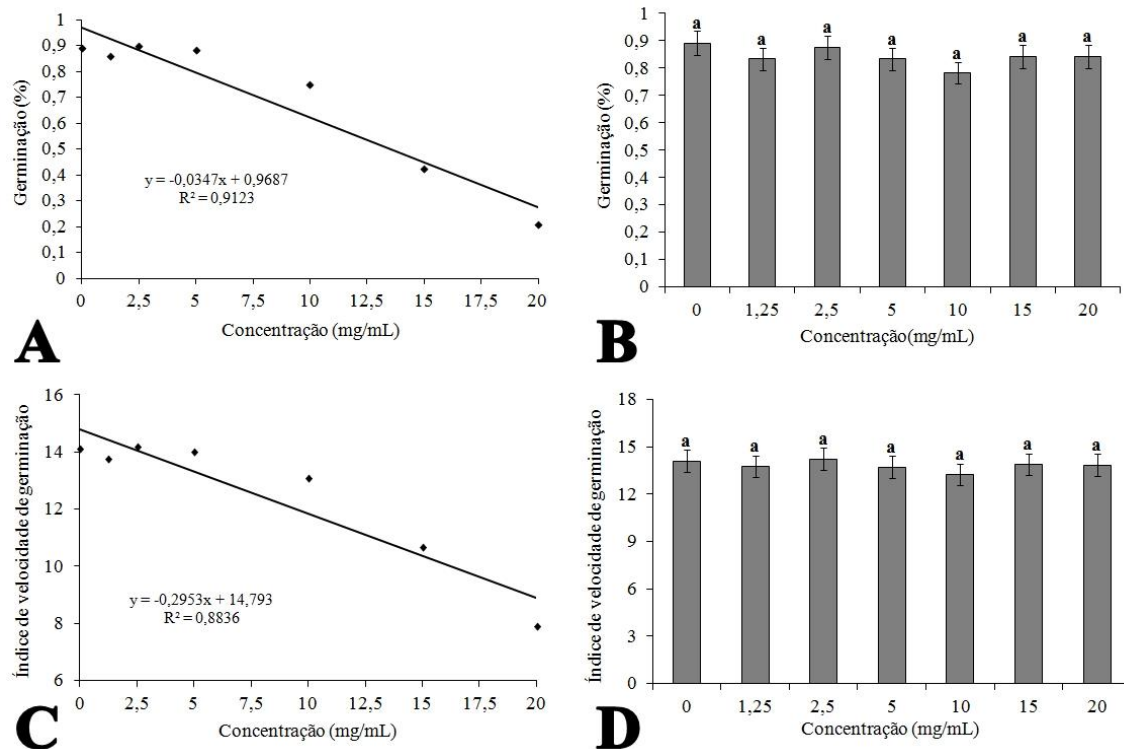
As variáveis analisadas foram: germinabilidade (G), índice de velocidade de germinação (IVG), Biomassa Fresca (BF), Biomassa Seca (BS) e índice mitótico (IM). Os

dados obtidos foram submetidos a análise de variância e posteriormente foram ajustados modelos de regressão linear. Os casos em que os modelos não se ajustaram aplicou-se o teste teste Scott-Knott com nível de 5% de significância. As análises foram realizadas com auxílio do software Sisvar 5.0.

## **RESULTADOS**

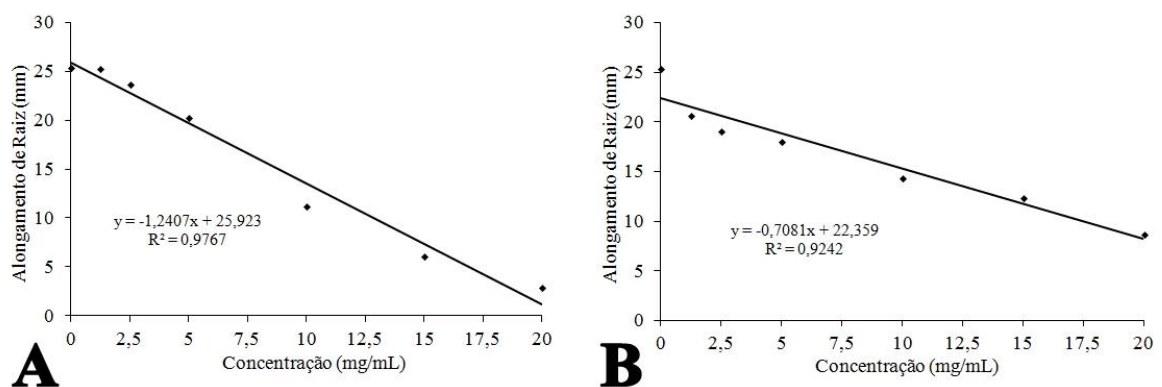
O efeito dos extratos de Bacupari sobre a germinação de *L. sativa* é observado na Figura 1. Nota-se que o controle apresenta uma germinação próxima de 90% para ambos os testes, firmando a viabilidade do bioensaio. No entanto, o extrato de pericarpo causou atraso sobre o número de cipselas germinadas, de maneira dependente da concentração. Porém para o extrato da semente, o efeito da germinação foi discreto, sendo que mesmo após 24 horas, não houve diferença com relação ao controle.

O efeito demonstrado na germinação foi coerente com o encontrado no índice de velocidade de germinação (IVG) dos extratos (Figura 1). Novamente, o extrato de pericarpo provocou uma redução do IVG ao longo das concentrações testadas e o extrato da semente não apresentou diferença estatística em relação ao controle. Estes resultados demonstram que o extrato de pericarpo apresentou efeito tanto sobre o número de sementes germinadas quanto sobre o IVG, sendo expressados pelo modelo ajustado de regressão linear.



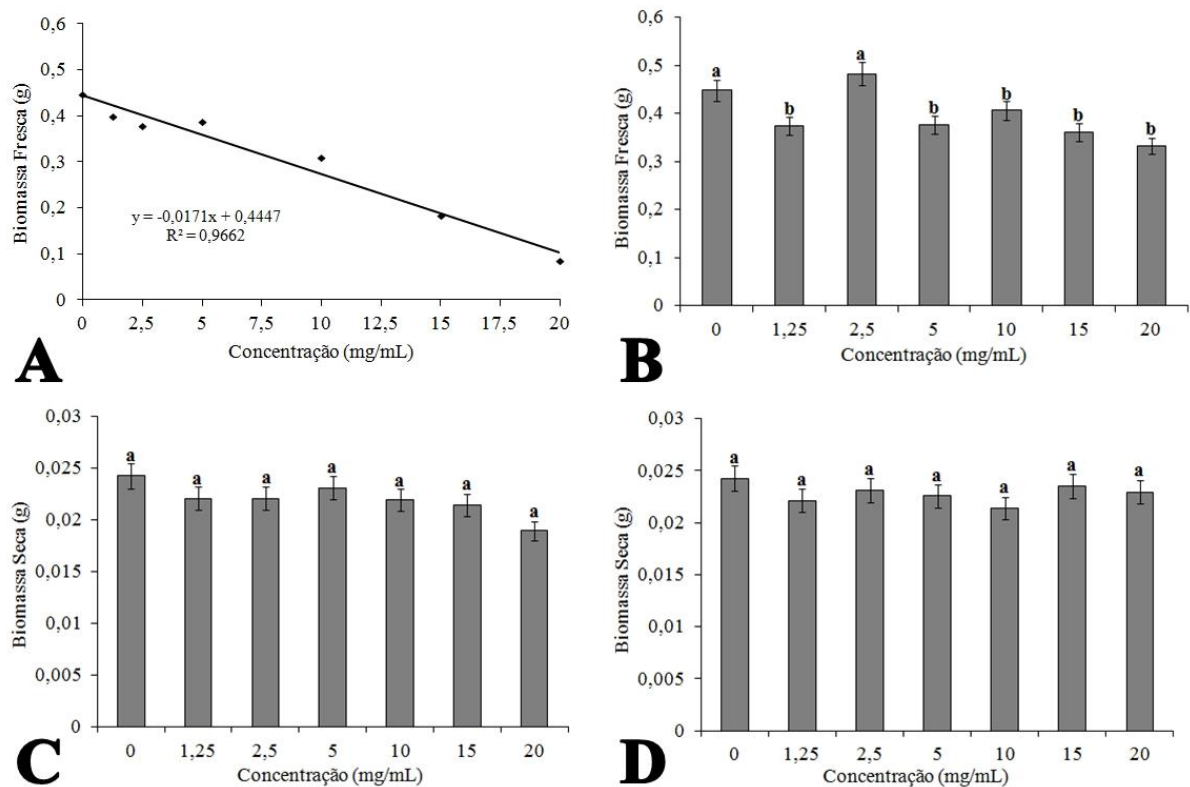
**Figura 1:** Germinação e Índice de velocidade de Germinação de plantas de *L. sativa* submetidas a diferentes concentrações dos extratos de pericarpo (A e C) e semente de Bacupari (B e D). Letras diferentes indicam significância estatística.

Contrariamente ao efeito observado na geminação, o alongamento de raiz foi fortemente afetado pelos extratos testados, apresentando inibição do crescimento inicial de Alface de maneira dependente da concentração, conforme mostra o modelo ajustado de regressão (Figura 2). Além disso, que o extrato de pericarpo apresentou um efeito mais pronunciado em todas as concentrações analisadas.



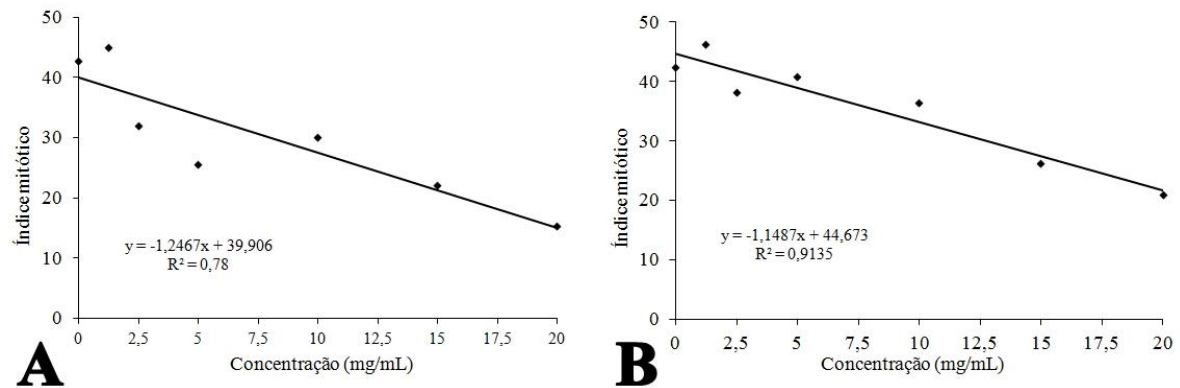
**Figura 2:** Alongamento de raiz em plantas de *L. sativa* submetidas a diferentes concentrações dos extratos de pericarpo (A) e semente de Bacupari (B).

Para a biomassa fresca, os extratos tiveram comportamentos distintos. O ESB apresentaram diferenças estatísticas apenas nos tratamentos iniciais (0 e 2,5 mg/mL) que apresentaram maior peso fresco, ao passo que as demais concentrações não demonstraram diferença estatística entre suas biomassas (Figura 3). Já o EPB observamos uma queda linear com o aumento das concentrações, sendo mais evidente nos tratamentos 15 e 20 mg/L. Em relação a biomassa seca, não foram observadas diferenças significativas para ambos extratos.



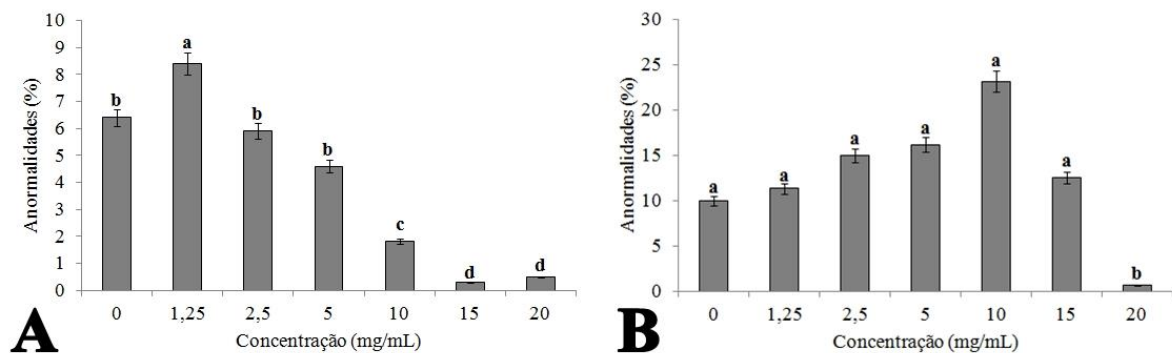
**Figura 3:** Biomassas fresca e seca de plantas de *L. sativa* submetidas a diferentes concentrações dos extratos de pericarpo (A e C) e semente de Bacupari (B e D).

Com o objetivo de investigar o possível mecanismo envolvido na inibição do crescimento da raiz, foram realizadas análises citogenéticas. O efeito dos extratos de Bacupari sobre o índice mitótico (IM) está mostrado na Figura 4. Nota-se que ambos extratos (ECB e ESB) provocaram alterações no ciclo celular, reduzindo o percentual de células em divisão. Os testes com EPB apresentaram queda linear da divisão celular a partir da concentração de 1,25 mg/mL. Embora seja observado a mesma redução linear, o efeito foi menos pronunciado com relação a EPB.

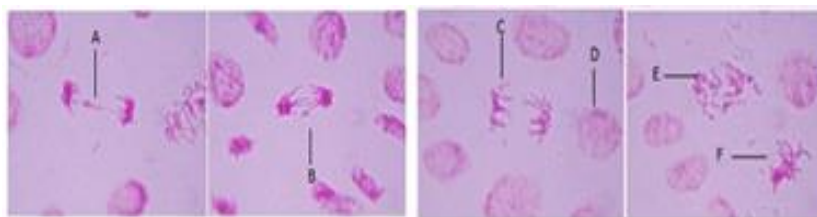


**Figura 4:** Índice mitótico de células meristemáticas de raiz de Alface expostas a diferentes concentrações de extrato de pericarpo (A) e de semente de Bacupari (B).

A ocorrência de anormalidades cromossômicas foi observada tanto em EPB, como em ESB. Porém em EPB, a redução da frequência de anormalidade foi visto ao aumento das concentrações, enquanto que em ESB o observou-se um aumento das anormalidades até a concentração de 10 mg/mL, e após isso uma redução bastante significativa. Na Figura 6 estão mostradas os tipos de anormalidades encontradas nas avaliações citológicas de ambos os tratamentos.



**Figura 5:** Frequência de Anormalidades de células meristemáticas de raiz de Alface expostas a diferentes concentrações de extrato de pericarpo (A) e de semente de Bacupari(B).



**Figura 6:** Anormalidades observadas. (A) Ponte Cromossômica,(B e C) Cromossomo Perdido, (D) Interfase, (E) C-Metáfase,(F) Metáfase.

## DISCUSSÃO

Observa-se que os extratos de pericarpo ocasionaram redução na germinabilidade e no IVG, isso pode ser explicado por Gatti et al. (2007) que ao avaliarem o efeito fitotóxico de diferentes espécies vegetais verificaram o atraso na germinação de cipselas de Alface, sem que houvesse inibição completa da germinação. Esses dados são coerentes, uma vez que a germinação é menos sensível aos aleloquímicos e, muitas vezes, o efeito fitotóxico não age sobre a germinabilidade e sim sobre a velocidade de germinação (FERREIRA et al.,2000). Além disso o efeito visível dos aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de efeitos ocorridos inicialmente a nível molecular e celular (Ferreira & Aquila 2000). Sendo a alteração na taxa de germinação, bem como nos índices de germinação por aleloquímicos um indício de interferências nas reações metabólicas que culminam na germinação (França *et al.* 2008).

Embora a germinação e o IVG não tenha sido afetada pelo ESB, o alongamento de raiz sofreu uma queda ao longo das concentrações. Esses resultados demonstram que o crescimento inicial das plantas é mais sensível que a germinação e, em geral, as raízes são mais vulneráveis as substâncias aleloquímicas do que outras estruturas das plântulas, uma vez que esse órgão é responsável por absorver os compostos bioativos presentes no ambiente (TURK, TAWAHA, 2002; CHON et al. 2000; FERREIRA et al. 2000).

De acordo com Rodriguez (2004) o IVG permite avaliar o efeito de compostos em baixas concentrações que não são suficientes para inibir a germinação, mas podem retardar ou inibir completamente o prolongamento da raiz. Sendo assim, a redução desse parâmetro pode indicar perda de sincronia nas reações metabólicas da germinação.

As análises de biomassa fresca e seca, são coerentes a alguns casos encontrados na literatura. Medeiros e Lucchesi (1993) não constataram alterações significativas na biomassa seca de plântulas de alface, quando submetidas a extratos de ervilhaca.

Hoffmann et al. (2007) observou a redução das biomassas frescas das plântulas de alface e picão-preto submetidas a extratos de espirradeira e comigo-ninguém-pode e a redução é proporcional ao aumento da concentração dos extratos. Dessa forma, a redução da biomassa fresca observada no presente trabalho, pode estar associada ao efeito fitotóxico da espécie *Garcinia Brasiliensis*.

O índice mitótico pode estar relacionado ao alongamento de raiz, uma vez que a zona meristema é responsável pela produção de novas células. Para Shulze e Kirscher (1986), as alterações no índice mitótico também se relacionam a perturbações na síntese de DNA e/ou proteínas. Além disso, a inibição do ciclo celular é um dos mecanismos de ação de herbicidas comerciais, como o pentaclorofenol, o 2,4 D e o Butaclor (ATTEQ et al.,2002). Assim, pode-se correlacionar o efeito observado em EPB e ESB a alteração na síntese de DNA e proteínas, que são eventos fundamentais para que a divisão celular ocorra normalmente. Dessa forma, os extratos testados apresentaram efeito citotóxico sobre o índice mitótico que pode estar relacionada a redução no alongamento da raiz. As alterações

Os resultados que expressam a frequência de anormalidade, embora apresentaram comportamentos distintos, podem ser explicados pelo mesmo princípio. Em EPB, ao aumentar as concentrações, a ocorrência de anormalidades foi reduzida, tal fato está de acordo com os resultados observados no alongamento de raiz, e índice mitótico. A inibição das reações metabólicas, descritas por Rodriguez (2004), que atuam na redução do alongamento da raiz, foi comprovado pela redução em células em divisão e por sua vez, pode estar relacionado a maior incidência de alterações estruturais cromossômicas. No entanto, para ESB, a incidência de anormalidades foram crescentes, e depois decaíram. Isso pode estar relacionado a proporção em células em divisão, visto que a partir de 10 mg/mL, a frequência de anormalidades reduziu drasticamente, porque o número de células em divisão, onde estas são ocorrem, foi muito inferior aos outros tratamentos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados indicam que os extratos etanólicos de pericarpo e de semente de Bacupari demonstraram potencial fitotóxico e citotóxico, ocasionando atraso na germinação

das cipselas e prejudicando o alongamento de raiz por provocar alterações no ciclo celular da zona meristemática de Alface. Porém para o extrato de pericarpo, tais efeitos foram mais pronunciados.

## BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, v. 62, p. 286-290.
- ATTEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. 2002. *Mutation Research*, v.514, p. 105-113.
- CHON, S. U.; COUTTS, J. H. NELSON, C. J. 2000. Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa of lentil. *Agronomy Journal*, v. 92, p. 715-720.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A.V. 2006. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumck x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, p. 26-35.
- DO NASCIMENTO, W. M. O.; DE CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. 2002. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rhedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Planch et Triana - CLUSIACEAE). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 555-558.
- DOS SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T.; BRAZ-FILHO, R. 1999. 7-Epiclusianone, the new tetraprenylated benzophenone and others chemical constituents from the fruits of *Rhedia gardneriana*. *Química Nova*, v.22, p.654–660.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. 2000. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 175-204.
- FRANÇA, A.C.; SOUZA, I.F. de; SANTOS, C.C. dos; OLIVEIRA, E.Q. de; MARTINOTTO, C. (2008). Atividades alelopáticas de nim sobre o crescimento de sorgo, alface e picão-preto. *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, n.5, p.1374-1379.
- FRUTUOSO, V. S.; MONTEIRO, M. M.; AMENDOERA, F. C.; ALMEIDA, A. L. F.; NASCIMENTO, D. D.; BERENGER, A. L. R., et al. 2007. Analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Rhedia longifolia* Planch & Triana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p. 91–96.
- GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; FERREIRA, A. Ç. 2007. Avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de espécie de cerrado. *Revista Brasileira de Biociências*, v.05, p. 174-176.



- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. 2002. Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec, São Paulo, p. 131.
- HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.6, n.1, p. 11-21.
- JOLY, A.B. 2002. *Botânica – Introdução à taxonomia vegetal*. 6 ed. São Paulo: Editora Nacional. p. 332-334.
- LORENZI, H. 2008. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Nova Odessa, v. 2, p.353.
- MAZZAFERA, P. 2003. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Structure Brasileira de Botânica*, v.26 (2), p. 231-238.
- MEDEIROS, A. R. M. de; LUCCHESI, A. A. (1993) Efeitos alelopáticos da ervilhaca (*Vicia sativa* L.) sobre a alface em testes de laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.1, p.9-14.
- MORTON, J. 1987. *Fruits of warm climate*. Miami: Julia F. Morton, p.309-310.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; DE CASTRO, E. M. 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agroambiente*, v. 7 (1), p. 36-43.
- RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; SILVA, M. P.; MASELLI, B. S.; BEIJO, L. A.; KUMMROW, F. 2013. Fitotoxicidade citogenotóxica de água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, p. 1099-1108.
- RODRIGUÉZ, M. T. T. 2003. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.*, v. 41, p. 2-3.
- RIBEIRO, L. O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. 2012. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, p. 220-225.
- POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B. 2004. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. *IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal*, Corumbá.
- SCHULZE, E.; KIRSCHER, S. 1986. Microtubule dynamics in interphase. *Journal of Cell Biology*, v.102, p. 1020-1021.
- SIMÕES, M. S.; MANDAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. L. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. *Biotemas*, v.26 (3), p. 29-36.
- TURK, M. A.; TAWAHA, A. M. 2002. Inhibitory effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of lentil. *Agronomy Journal*, v.1, p. 28-30.