

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**BÁRBARA CHRISTINA SILVA AMÂNCIO**

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FOLHAS E FRUTOS DE *Byrsonima* spp.  
(MALPHIGIACEAE) EM *Lactuca sativa* L.**

**Alfenas/MG  
2016**

**BÁRBARA CHRISTINA SILVA AMÂNCIO**

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FOLHAS E FRUTOS DE *Byrsonima* spp.  
(MALPHIGIACEAE) EM *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas. **Orientador:** Prof. Dr. Sandro Barbosa. **Coorientadora:** Dra. Luciene de O. Ribeiro Trindade. **Colaboradores:** Kamilla Pacheco Govêa (Bolsista PIBIC/CNPq).

**Alfenas/MG  
2016**

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

Amâncio, Bárbara Christina Silva.  
Bioatividade de extratos de folhas e frutos de *Byrsonima* spp.  
(Malphigiaceae) em *Lactuca sativa* L. / Bárbara Christina Silva  
Amâncio. -- Alfenas/MG, 2016.  
67 f.

Orientador: Sandro Barbosa.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Murici (Planta). 3. Extração por solventes. I.  
Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD 583.79

**BÁRBARA CHRISTINA SILVA AMÂNCIO**

**“Bioatividade de extratos de folha e frutos de *Byrsonima* ssp. (*Malpigiaceae*) em *Lactuca sativa* L.”**

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

Aprovado em: 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Sandro Barbosa  
Instituição: UNIFAL - MG

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



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

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



Profa. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro  
Instituição: UFSJ/Katholieke Universiteit  
Leuven (KU Leuven)/Belgium

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



*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e minha avó.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por guiar meus passos e dar forças para conduzir com determinação meus objetivos;

Aos meus familiares: meu pai (Auber Amâncio), minha mãe (Marly Aparecida da Silva), meus irmãos (Paulo Henrique, Gabriella e Ricardo), minha avó (Barbara Costa da Silva), pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado;

Ao meu Pai Ciência e Orientador, professor Dr. Sandro Barbosa, pela orientação, oportunidade, confiança mas acima de tudo, pelo imenso carinho e amizade;

A minha coorientadora, Dra. Luciene de O. Ribeiro Trindade, pelas valiosas contribuições, pela doçura das palavras usadas no dia a dia, paciência e pelos momentos compartilhados;

Ao Lucas Rosado pelo suporte, amor e confiança;

A todos meus amigos de Alfenas em especial Vitor Costella, Bruna Martins, Sara Rosado, Tamires Gonçalves, Paula Galvão, Silvia Cândido, Kamilla Pacheco, Ana Livia, Bianca Bacelar e a Rep. Miokitatenu pela amizade, companheirismo e força para continuar;

Aos meus amigos e companheiros do BIOGEN pelos momentos de alegria, pela amizade e colaboração. Um agradecimento especial a Kamilla Pacheco Govêa por sua amizade, confiança e por toda ajuda proporcionada durante esses 2 anos, Antônio Neto e Marília Carvalho pela ajuda na condução dos experimentos e Lenise Barbosa por ser uma mãe, sempre a disposição;

Aos professores Dr. Thiago Correa, Dr. Chavasco, Dr. Geraldo Alves, Dr. Marcelo Polo, Dr. Breno Régis, Dr. Plínio Rodrigues pela disponibilidade e contribuições dadas para a melhoria desse trabalho;

A CAPES, pelo auxílio financeiro;

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

*"Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois Jeová, o seu Deus, estará com  
você por onde você andar".*

***(BÍBLIA, Josué 1:9)***

## RESUMO GERAL

O gênero *Byrsonima* é caracterizado pela alta plasticidade fenotípica e composição florística na América do Sul. *B. verbascifolia* e *B. intermedia*, popularmente conhecidas como Murici-cascudo e Murici-pequeno, respectivamente, são espécies conhecidas pela presença rica de taninos, saponinas, catequinas, flavonoides, triterpenos e glicolipídios, que são metabólitos secundários importantes para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas e agindo como compostos alelopáticos. A alelopatia é conhecida como interação bioquímica entre vegetais no meio ambiente causando interação planta/planta por meio da competição podendo ser testada por meio de bioensaios utilizando diversos parâmetros. *Lactuca sativa* L. é uma espécie amplamente utilizada como bioteste, por apresentar grande sensibilidade mesmo quando exposta a baixas concentrações de amostras ambientais e tóxicas. Esta dissertação é apresentada em forma de capítulos de maneira que, o capítulo 1 apresenta uma breve revisão sobre a caracterização botânica de *Byrsonima* spp., metabólitos secundários de *Byrsonima* spp., alelopatia e quimioecologia, bioensaios com *Lactuca sativa* L. para estudos de fitotoxicidade e formas de extração. O capítulo 2 apresenta-se em forma de artigo I e artigo II. No artigo I objetivou-se estudar as propriedades fitotóxicas e citogenotóxicas das folhas e frutos de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* em *L. sativa* L. utilizando o método sanduiche. Verificou-se que frutos de *B. intermedia* são responsáveis pela maior inibição da germinação de alface em relação às folhas dessa espécie. O alongamento de raiz de alface exposta aos órgãos de *B. verbascifolia* demonstrou efeitos estimulatórios e os órgãos de *B. intermedia* apresentaram efeitos inibitórios no crescimento das raízes. O índice mitótico evidenciou efeito alelopático de *Byrsonima* spp. pela redução da divisão celular no meristema radicular de alface, sendo o estímulo no alongamento de raízes provocado por *B. verbascifolia* compreendido como consequência de expansão celular e não de atividade mitótica. Foi observado efeito aneugênico das espécies de *Byrsonima* spp. sendo a maior frequência de C-metáfase e stickness em frutos de *B. verbascifolia* e folhas de *B. intermedia*. O artigo II apresenta um trabalho cujo objetivo foi averiguar a fitotoxicidade de diferentes extratos foliares de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* em bioensaio com *Lactuca sativa* L. Os resultados evidenciaram que os extratos de folhas de *B. verbascifolia* e *B. intermedia*, sobretudo o extrato etanólico, possuem potencial fitotóxico e citotóxico. Esses efeitos diferem em função da forma de extração (aquoso frio, quente e etanólico), provavelmente devido à composição dos metabólitos secundários.

**Palavras chave:** Alelopatia. Murici-pequeno. Murici-cascudo. Método sanduiche. Formas de extração.



## ABSTRACT

The *Byrsonima* genus is characterized by high phenotypic plasticity and composition in South America. *B. verbascifolia* and *B. intermedia*, popularly known as Murici-cascudo and Murici-pequeno, respectively, are known species by the rich presence of tannins, saponins, catechins, flavonoids, triterpenes and glycolipids, secondary metabolites that are important for the development and survival of plants, and act as allelopathic compounds. Allelopathy is known as plant biochemical interaction between the environment causing interaction plant/plant through competition can be tested by bioassay using various parameters. *Lactuca sativa* L. is a species widely used as a bioassay for presenting high sensitivity even when exposed to low concentrations of toxic and environmental samples. This work is presented in the form of chapters so that, Chapter 1 provides a brief review of the botanical characterization *Byrsonima* spp., secondary metabolites of *Byrsonima* spp., allelopathy and quimioecology, bioassays with *Lactuca sativa* L. for phytotoxicity studies and forms of extraction. Chapter 2 presents in the form of paper I and paper II. Paper I aimed to study the phytotoxic properties and cytogenotoxic of leaves and fruits of *B. verbascifolia* and *B. intermedia* in *L. sativa* L. using the sandwich method. It was found that fruits of *B. intermedia* are responsible for the inhibition of germination of lettuce leaves with regard to this species. The lettuce root elongation organs exposed to *B. verbascifolia* showed stimulatory effects and organs of *B. intermedia* showed inhibitory effects on the growth of roots. The mitotic index showed allelopathic effect of *Byrsonima* spp. the reduction of cell division in root meristem of lettuce, and stimulating the roots stretching caused by *B. verbascifolia* understood as a consequence of cell expansion and not of mitotic activity. It was observed effect aneugenic of *Byrsonima* spp. being the highest frequency of C-metaphase and stickness in fruits of *B. verbascifolia* and leaves of *B. intermedia*. Paper II presents a work whose purpose was to determine the phytotoxicity of different plant extracts of *B. verbascifolia* and *B. intermedia* in bioassay *Lactuca sativa* L. The results showed that the extracts of leaves of *B. verbascifolia* and *B. intermedia*, especially ethanol extract, have phytotoxic and cytotoxic potential. These effects are different depending on the extraction form (aqueous cold, hot and ethanol), probably due to the composition of secondary metabolites.

**Palavras chave:** Allelopathy. Murici-cascudo. Murici-pequeno. Sandwich Method. Forms of extraction.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DE BYRSONIMA SPP.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE BYRSONIMA SPP.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>ALELOPATIA E QUIMIOECOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>BIOENSAIOS COM <i>Lactuca sativa</i> L.: UMA FERRAMENTA PARA ESTUDOS DE FITOTOXICIDADE.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>EXTRAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS VEGETAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>30</b>
	<b>ARTIGO I: Sandwich Method Applied to the Screening of Allelopathic Action in <i>Byrsonima</i> spp. (Malpighiaceae) Species.....</b>	<b>31</b>
	<b>ARTIGO II: AÇÃO ALELOPÁTICA DE DIFERENTES EXTRATOS DE FOLHA DE <i>Byrsonima</i> spp. (MALPIGHIACEAE) SOBRE BIOTESTE DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i> L.).....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado a savana mais rica em biodiversidade vegetal e é mundialmente conhecido pela potencialidade farmacológica de suas plantas devido às suas propriedades medicinais, além das propriedades condimentares. E embora muito se tenha estudado sobre os aspectos farmacológicos e toxicológicos das plantas brasileiras, poucos estudos abordam as possíveis interações ecológicas que são mediadas pelos metabólitos secundários produzidos por essas plantas (ARAÚJO et al., 2014; JUNQUEIRA; OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss. é uma espécie nativa do Cerrado pertencente à família Malpighiaceae que possui grande potencial medicinal. É utilizado popularmente para o tratamento de enfermidades tais como diarreia, febre, apresentando propriedade cicatrizante, antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorragica e anti-inflamatória (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011; MOREIRA et al., 2011; SALDANHA; SOARES, 2015). Possui conhecida produção de compostos voláteis nos frutos, e metabólitos secundários nas folhas, como glicolipídios, triterpenos e ácidos triterpênicos; e também no tronco, como taninos e proantocianidinas (FIGUEIREDO et al., 2005; PINTO; KOLB, 2015).

Na espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss, os frutos possuem sabor agridoce e são consumidos no meio rural como alimento. Além dos frutos, outras partes da planta são empregadas pelas populações rurais no tratamento de enfermidades (LORENZI, 2008). A casca do caule é utilizada na maior parte dos trabalhos de pesquisa para obtenção de extratos, nos estudos da sua composição química e da sua ação biológica (BAUAB; VARANDA; CARDOSO, 2015). Para a extração da casca, muitas vezes, é necessário à retirada da planta inteira do local, o que vem provocando uma redução da população de Murici-pequeno (HOMMA, 1993).

Os estudos sobre os efeitos alelopáticos relacionam a ação aleloquímica e outros aspectos da biologia da planta-alvo, como as respostas relacionadas aos parâmetros germinativos, de crescimento e desenvolvimento inicial, o comportamento do complemento cromossômico exposto aos toxicantes advindos das diferentes formas de extração dos princípios ativos e ainda da sua ação sobre os aspectos fotossintéticos (REIGOSA et al.; SILVA; ÁQUILA, 2006).

Não foram encontrados estudos na literatura sobre o efeito de citogenotoxicidade de extratos dos órgãos do Murici-pequeno e Murici-cascudo sobre a dinâmica do genoma nuclear

de biotestes vegetais. Nesse sentido, determinar os efeitos alelopáticos bem como a capacidade desses extratos em gerar modificações no DNA nuclear e na fisiologia de outras plantas faz-se necessário para subsidiar estudos sobre os processos de interação ecológica dessa planta com outras bem como contribuir para estudos farmacológicos.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a fitotoxicidade e citotoxicidade de diferentes tipos de extratos de folhas e frutos de duas espécies de *Byrsonima* spp. em bioensaio com *Lactuca sativa* L.

## 2 DESENVOLVIMENTO

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

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DE *BYRSONIMA* SPP.

A família Malpighiaceae compreende aproximadamente 68 gêneros e 1250 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais, principalmente Norte e Nordeste do Brasil (SOUZA; LORENZI, 2012). São plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou, mais frequentemente, trepadeiras com folhas inteiras, de disposições opostas, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração, em geral, amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, diclamídeas, de simetria zigomorfa, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. As pétalas, em geral, são fimbriadas, longipedunculadas e o androceu é formado por dez estames como ocorrem em várias espécies de *Byrsonima* (JOLY, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

O gênero *Byrsonima* é caracterizado por alta plasticidade fenotípica, com ampla ocorrência nas diversas composições florísticas da América do Sul (MAMEDE, 2014). Apresenta uma riqueza na presença de taninos, que são metabólitos secundários fenólicos, de sabor adstringente encontrados no interior dos vacúolos vegetais, conforme verificado por Castro et al. (2009) e Carvalho (2010), e que apresentam atividade antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarreica, cicatrizante e anti-inflamatória. O chá da casca do caule apresenta atividade que combate diarreia e disenteria (NOGUEIRA et al., 2008).

O Murici-cascudo (*Byrsonima verbascifolia*) é uma espécie lenhosa arbustiva ou arbórea de até 4 m. Seu tronco é muitas vezes torto e ramificado, de casca áspera muito fragmentada, com ramos grossos fortemente suberificados. Suas folhas são opostas, obovadas e agudas, densamente pilosas em ambas as faces, podendo atingir cerca de 25 cm de

comprimento por 13 cm de largura; nos ramos novos estão dispostas em tufos (Fig 1). São avermelhadas quando novas e tornam-se verdes na face superior e acinzentadas na face inferior quando maduras. O pecíolo é curto e largo, as flores são alaranjadas em cachos de eixo piloso e o fruto do tipo drupa (FERRI, 1969). Quando maduros, os frutos possuem epicarpo e polpa succulenta, sabor adocicado e cheiro característico (LORENZI, 2008).

Figura 1 - Folhas e frutos de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.

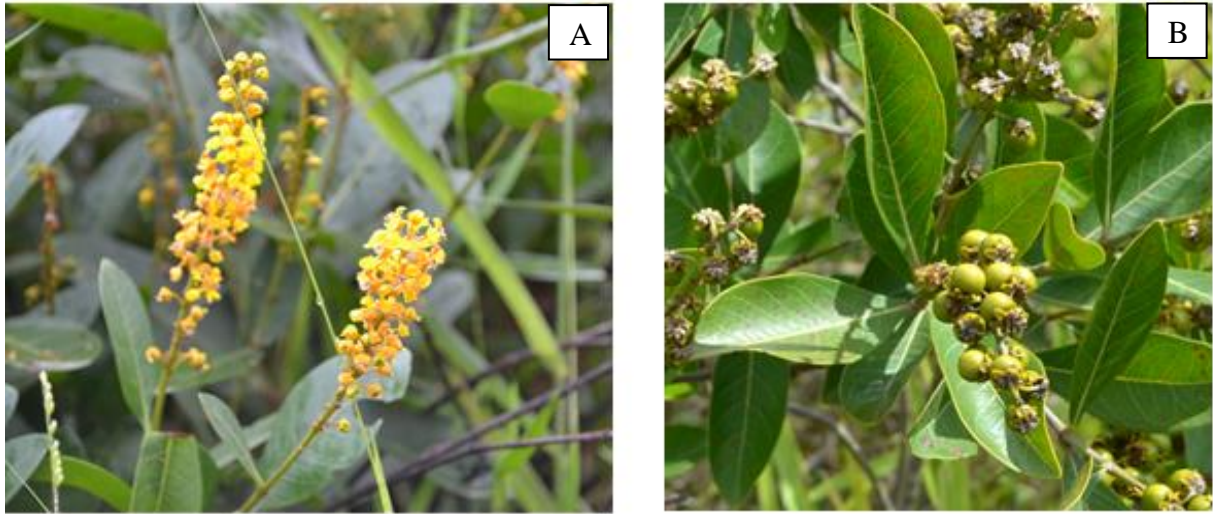


Fonte: Amâncio (2014).

Além do uso na medicina popular, os frutos do Murici-cascudo são utilizados na alimentação dos moradores do Cerrado e possuem elevada importância como fonte de renda dos mesmos na fabricação de doces, sucos, licores, sorvetes e no consumo *in natura* (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011; GUSMÃO; VIEIRA; FONSECA, 2006).

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) é uma espécie arbustiva, podendo apresentar vários ramos (Fig. 2). Possuem folhas opostas lanceoladas, glabras, flores amarelas em cachos terminais. Seus frutos são do tipo drupóide, indeiscentes, endocarpo lignificado, consistência carnosa e coloração amarela (FERRI, 1969; SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

Figura 2 - *Byrsonima intermedia* A. Juss. A. Inflorescência B. Folhas e frutos.



Fonte: Amâncio (2014).

Carvalho e Nascimento (2008) e Carvalho et al. (2009) observaram que *Byrsonima intermedia* possui baixa taxa de germinação e emergência lenta em comparação com outras espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbascifolia*. Além disso, as sementes apresentam dormência tegumentar. A floração e frutificação ocorrem de outubro a dezembro e são atrativos para aves possuindo assim um grande potencial para recuperação de áreas degradadas (ARAÚJO et al., 2014; GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

## 2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *BYRSONIMA* SPP.

Os metabólitos secundários por muito tempo foram considerados como produtos residuais do metabolismo, sem uma função particular nas plantas. Porém assim como os primários eles estão intimamente ligados a processos vitais para as plantas (HARVEY; FERRIER, 2005; HERBERT, 1989; PEREIRA; CARDOSO, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2002).

Canhoto (2010) confere a importância dos metabólitos secundários nas plantas como vitais para o desenvolvimento e sobrevivência das espécies, pois as protegem contra predadores e microrganismos patogênicos. Funcionam como compostos alelopáticos (conferindo uma vantagem competitiva relativamente a outras plantas), na atração de agentes

polinizadores ou dispersores de sementes, na proteção contra radiações, no armazenamento de nitrogênio e na regulação do balanço hídrico das plantas (WINK, 2010).

Estudos fitoquímicos das espécies *B. verbascifolia* e *B. intermedia* revelaram a presença de triterpenos, glicolipídios, saponinas, taninos, catequinas e flavonoides (FELÍCIO et al., 1995; GONÇALVES et al., 2013; PINTO; KOLB, 2015; SALDANHA; SOARES, 2015). Segundo Schenkel et al. (2000) lupeol e  $\alpha$ -amirina são saponinas do tipo triterpenos pentacíclicos. Essas saponinas triterpênicas encontram-se, predominantemente em eudicotiledôneas e magnoliideas.

O gênero *Byrsonima* também apresenta casca rica em taninos (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Estes estão entre os principais grupos de metabólitos secundários. São compostos fenólicos, em geral polifenóis de alto peso molecular, de estrutura química variável, com moléculas grandes, por isso, não costumam ser absorvidos pelo tubo digestivo. Os taninos possuem afinidade de precipitarem proteínas, geralmente de forma irreversível, formando complexos insolúveis, são empregados na curtição de couros e peles. O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra microrganismos patogênicos (AZEVEDO et al., 2015). Suas características defensivas e protetoras contra ataque de herbívoros residem justamente na capacidade de precipitarem proteínas, apresentando, conseqüentemente, sabor adstringente e de difícil digestão, já que as enzimas digestivas não conseguem atacar esses precipitados (SOUZA et al., 2005).

Assim, os compostos encontrados nas plantas podem ser uma alternativa oportuna para a agricultura no controle de plantas daninhas sem causar danos ao ambiente, permitindo obter produtos de alta qualidade sem a presença de agentes contaminantes através dos chamados bioherbicidas (ZENG et al., 2010).

### 2.3 ALELOPATIA E QUIMIOECOLOGIA

O metabolismo das plantas é definido como conjunto total de transformações das moléculas orgânicas, suprindo o organismo de energia e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). O metabolismo primário é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, açúcares e outras substâncias (CHAMPE et al., 2008).



O segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas – geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas, como a alelopatia (BERG; LUBERT, 2008).

De acordo com Baltz, Demai e Davies (2010), a biossíntese de determinados compostos secundários pode ocorrer em todos os tecidos de uma dada espécie vegetal. As suspensões celulares de calos cultivados *in vitro* podem ser utilizadas para a cultura em escala comercial de células vegetais das quais os metabólitos secundários podem ser extraídos (CASTRO et al., 2016; GOPI; VATSALA, 2006).

Os metabólitos secundários são classificados quanto à estrutura química: nitrogenados (alcaloides, aminoácidos não proteicos e glicosídeos cianogênicos), terpenóides (óleos essenciais, triterpenos, saponinas e glicosídeos cardioativos) e fenólicos (ligninas, flavonoides e taninos) conforme descrito por Corrêa et al. (2008). E esses produtos secundários têm papel importante na adaptação das plantas aos ambientes, pois contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas.

Dentre as interações ecológicas entre as plantas podemos destacar a competição. As plantas competem por luz, água e nutrientes, revelando uma concorrência constante entre as espécies que vivem em comunidade. Essa competição contribui para o equilíbrio das espécies no ecossistema, e algumas desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de determinados metabólitos secundários, liberados no ambiente por meio de exsudação, volatilização, lixiviação e/ou decomposição dos resíduos que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta (GONÇALVES, 2016; LARA-NUÑEZ et al., 2006). Para Duke (2015), alelopatia é uma interação planta/planta, na qual um vegetal compete com outro, e isso ocorre para assegurar o fornecimento de água, luz e nutrientes.

A alelopatia pode ser definida como interação bioquímica entre vegetais no meio ambiente causando efeito sobre a planta-alvo impedindo ou estimulando a germinação, bem como o processo de divisão celular, influenciando no crescimento e desenvolvimento de outras plantas (PERGO; ISHII-IWAMOTO, 2011; REIGOSA et al., 2013; SILVA; ÁQUILA, 2006). Efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários, denominados aleloquímicos (RIZVI; RIZVI, 1992). Rice (2012) relata que os aleloquímicos podem ser encontrados em todas as partes dos vegetais: caule, folhas, raízes, flores, frutos e sementes. Entretanto, muitos estudos são realizados utilizando folhas como principal fonte dessas substâncias (DE OLIVEIRA et al., 2014; SALDANHA et al., 2013).

A realização de estudos sobre as influências alelopáticas entre espécies é de suma importância, pois possibilita o conhecimento dos efeitos e das interações inter e intra-específicas de plantas, podendo ser notadas, por exemplo, através das alterações sobre a germinação e o índice de velocidade de emergência das plantas. Com isso o pesquisador pode identificar possíveis causas do insucesso no estabelecimento, na persistência de espécies vegetais em campo e resultar em uma adequação do manejo das espécies (OLIVEIRA et al., 2014).

De acordo com Prates et al. (2001), a maioria das pesquisas em alelopatia refere-se ao efeito aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, não considerando os efeitos celulares relacionados às mudanças fisiológicas do bioensaio. Segundo os mesmos autores, os efeitos visíveis observados em muitos estudos de alelopatia são sinais secundários de mudanças ocorridas ao nível do DNA que podem ser identificados tanto citologicamente quanto citogeneticamente (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; LEME; MARIN-MORALES, 2009; PAULA et al., 2015).

#### 2.4 BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa* L.: UMA FERRAMENTA PARA ESTUDOS DE FITOTOXICIDADE

Os bioensaios constituem um método para medição da resposta de organismos expostos a diferentes concentrações de uma amostra, realizados em laboratórios sob condições específicas e controladas (RIZZO, 2011). Estudos de fitotoxicidade utilizam diversos parâmetros com a finalidade de averiguar os efeitos tóxicos das substâncias testadas. Dentre alguns podemos citar: taxa de germinação, índice de velocidade de germinação, alongamento de raiz, biomassa fresca, biomassa seca, tempo médio de germinação, taxa de plântulas normais desenvolvidas, alongamento da parte aérea, alongamento do hipocótilo, número de sementes mortas e sementes não germinadas, índice de velocidade de emergência, percentagem de emergência, além de aspectos micromorfológicos de plântulas (BORELLA et al., 2014; JUCHEM et al., 2013; NUNES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014).

Segundo Rizzo (2011) os parâmetros avaliados nos bioensaios são visualizados nos efeitos sobre a germinação e crescimento da planta, sendo manifestações secundárias das

modificações que ocorrem em nível molecular. Estudos sobre o comportamento das espécies-alvo são essenciais, assim como as combinações genótípicas, aspectos germinativos, desenvolvimento inicial e o comportamento do complemento cromossômico, possibilitando a identificação de polimorfismo cromossômico e fornecendo informações sobre possíveis alterações na estrutura e no número dos cromossomos (ANDRADE et al., 2008; REIGOSA et al., 2013).

A literatura descreve que nos estudos sobre os efeitos de aleloquímicos podem ser utilizadas como bioensaios sementes nativas ou de espécies cultivadas, entre elas se destacam alface e cebola (FREITAS et al., 2015; RICE, 1984; SIMÕES et al., 2013). Para avaliar os efeitos danosos que os mutagênicos podem causar é necessária a observação de constante divisão mitótica no tecido da planta, sendo possível analisar as etapas da divisão celular, com o objetivo de identificar os efeitos tóxicos e alterações cromossômicas ao longo do processo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014).

A principal vantagem do uso de *Lactuca sativa* como alvo nos estudos alelopáticos reside na sensibilidade da espécie, mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos e baixo custo de pesquisa. Além disso, a espécie apresenta outras peculiaridades que favorecem sua utilização como: germinação rápida em aproximadamente 24h; crescimento linear em ampla faixa de variação de pH; baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos dos extratos; pequeno número de cromossomos e presença de cromossomos grandes sendo as duas últimas características facilitadoras para análises citogenéticas (CAMPOS et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MORAES et al., 2015; RICE, 1984; SIMÕES et al., 2013; SOUSA et al., 2009).

## 2.5 EXTRAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS VEGETAIS

De acordo com Simões et al. (2007a), a extração é o primeiro passo para a análise de plantas medicinais, pois permite a retirada de substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal. Basicamente o preparo da droga vegetal se resume na pré-lavagem, secagem e/ou liofilização, moagem do material botânico para obtenção de uma amostra homogênea, facilitando para que haja o aumento da superfície de contato da amostra com o sistema de solventes. São necessárias medidas adequadas para assegurar que os potenciais componentes

ativos não serão perdidos, distorcidos ou destruídos durante a preparação do extrato a partir de amostras de plantas. Na extração de compostos hidrofílicos (polar), são usados solventes polares tais como água, metanol, etanol ou acetato de metila. Para a extração de compostos lipofílicos (apolar) são usados diclorometano ou uma mistura de diclorometano / metanol na proporção de 1:1 (SASIDHAREN et al., 2011).

O processo de extração de substâncias pode ocorrer por diversas técnicas. A diferença nos processos pode ocorrer com relação aos tipos de solventes, que pode ser água, etanol, metanol entre outros e à temperatura de extração, que pode ser frio ou a quente, levando em consideração os compostos alvos sendo assim necessária a adequação nos métodos de extração (SIMÕES et al., 2007a).

A extração aquosa a frio tem como vantagem a preservação de princípios ativos termolábeis. Um dos tipos de extração a frio é a maceração, na qual se coloca o extrato em contato com o solvente (água) em temperatura ambiente em recipiente fechado por seis horas e, posteriormente, submete-se à temperatura de 6° C. No caso da extração aquosa a quente, a desvantagem é a perda de princípios termolábeis, porém é uma técnica muito utilizada embasada em Áquila (2000) e Pires et al. (2001), visando maior extração e obtenção de substâncias menos solúveis da planta, além de auxiliar na redução de contaminações devido à temperatura elevada da água. A extração ocorre por meio da submissão do material vegetal ao solvente a temperatura de 80° C até atingir temperatura ambiente (CUNHA et al., 2004; SAKANAKA et al., 2004).

A extração também pode ser feita utilizando etanol, cuja vantagem é a retirada de substâncias ativas como gomas, resinas, alginatos e heterosídeos, além de ser um meio desfavorável à propagação microbiana (SIMÕES et al., 2007b). Esse método envolve colocar o extrato em contato com etanol (70%) por no mínimo 7 dias, filtrar e coloca-lo em rotaevaporador. Só após a total exaustão do etanol esse extrato é usado para diluição a 5%.

Além disso, os extratos de plantas também são preparados por maceração ou percolação de plantas verdes frescas ou secas em pó vegetal. Conforme desenvolvido por Fujii (1994), o método sanduiche consiste no uso de órgãos da planta secas em pó vegetal, colocado entre duas camadas de ágar, permitindo a translocação de compostos solúveis em água até a planta-teste e determinando a atividade alelopática de lixiviados de plantas (FUJII et al., 2003; 2004; MORITA et al., 2005). Este método também foi utilizado no Paquistão por Anjum et al. (2010) e Khan et al. (2009), no Peru por Morikawa et al. (2012) e no Brasil, para a triagem de plantas medicinais e estudo de espécies de plantas invasoras (CÂNDIDO et al., 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* A. Juss. são espécies exploradas na medicina popular, estudar as propriedades alelopáticas e fitotóxicas das folhas e frutos dessas plantas pode auxiliar na triagem de possíveis efeitos citogenotóxicos contribuindo para orientar o uso adequado dessas espécies na medicina popular bem como informações significativas para análises fitoquímicas.

Nesse sentido, bioensaios que utilizam modelos vegetais devem ser selecionados por critérios rigorosos para permitirem uma avaliação significativa do potencial fitotóxico e citogenotóxico dos aleloquímicos contidos nos diferentes extratos, sendo capazes de induzir alterações no material genético que resultem em efeitos sobre a germinação e o desenvolvimento de plantas testes. *Lactuca sativa* L. tem sido utilizado rotineiramente em laboratórios de todo o mundo que trabalham com genética toxicológica, sendo considerada uma ferramenta valiosa quanto à determinação da atividade tóxica de extratos e princípios ativos isolados de diferentes espécies, por apresentar sensibilidade para expressar resultados mesmo sob baixas concentrações de substâncias tóxicas, além de possuir germinação rápida e homogênea, crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos.

Ressalta-se ainda, que foram encontrados na literatura poucos estudos de citogenotoxicidade dos diferentes órgãos de *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* sobre a dinâmica do genoma nuclear de biotestes vegetais que é o que se espera investigar neste trabalho por meio do emprego das técnicas citogenéticas clássica.

## 4 OBJETIVOS

A sessão a seguir trata dos objetivos gerais e específicos pretendidos neste trabalho.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a fitotoxicidade e citotoxicidade de folhas e frutos de duas espécies de *Byrsonima* spp. em *Lactuca sativa* L.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito fitotóxico de folhas e frutos de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* em *L. sativa* L. utilizando o método sanduiche.

Investigar a ação aleloquímica dos diferentes extratos de folhas de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* no comportamento de *Lactuca sativa* L. quanto à germinação, crescimento inicial e ciclo celular.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. A. V. et al. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae - Fabaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 621-625, 2008.

ANDRADE-VIERIA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

ANJUM, A. et al. Evaluation of allelopathic action of some selected medicinal plants on lettuce seeds by using sandwich method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 536-541, 2010.

ARAÚJO, M. M. et al. Application of the microbiological method DEFT/APC to detect minimally processed vegetables treated with gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 691-693, 2014.

AZEVEDO, T. K. B. et al. Qualidade dos taninos de Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) para a produção de adesivo tanino formaldeído. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, abr.-jun., 2015.

BALTZ, R. H.; DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. (ed.). Manual of industrial microbiology and biotechnology. **American Society for Microbiology Press**, 2010.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 545, 2008.

BETTINARDI, I. W. **Desenvolvimento do kit monitox (biomassa liofilizada de *Vibrio fischeri*) para o automonitoramento de toxicidade de efluentes industriais**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

BÍBLIA. Josué. Bíblia Sagrada. 98. cd. São Paulo: Ave Maria, J 995. Josué 1, vers. 9.

BORELLA, J. et al. Desempenho de sementes de plântulas de rabanete sob ação de extrato aquoso de folhas de *Trema micranta* (Ulmaceae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 108-116, 2014.

BORGES FILHO, H. C. B.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735-745, 2003.

CÂNDIDO, A. C. S. et al. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 268-272, jul./set. 2010.

CANHOTO, J. **Biologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra. 2010.

CARDOSO, C. R. P.; BAUAB, T. M.; VARANDA, E. A. Controle de qualidade e avaliação da atividade farmacológica do extrato de *Byrsonima intermedia* e da amentoflavona. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 3, p. 35-42. 2015.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Caracterização dos pirênios e métodos para acelerar a germinação de murici do clone Açú. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 775-781, 2008.

CARVALHO, J. E. U.; OLIVEIRA, I. V.; NASCIMENTO, W. M. O. Métodos para superação da dormência de sementes de murici. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 16. Curitiba. **Anais...**Londrina: Abrates. 2009. v. 19, n. 2, p. 582.

CARVALHO, M. A. F. **In vitro culture, Cryopreservation and medical properties of *Byrsonima intermedia***. 2010. 196f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CASTRO, A. H. F. et al. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 143-151, 2016.

CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr., 2009.

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



CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, v. 1-4, 1984.

CORRÊA, P. G. et al. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 3, p. 54-57, 2008.

CUNHA, I. et al. Factor that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 6, 2004.

DE OLIVEIRA, A. K. M. et al. Allelopathy and influence of leaves of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) on seed germination and seedling formation in lettuce= Alelopatia e a influência de folhas de *Palicourea rigida* (Rubiaceae) na germinação de sementes e na formação de plântulas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, 2014.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.

DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop-weed interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121-132, 2015.

FELÍCIO, J. D. et al. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 62, p. 91-92, jan./dez. 1995.

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

FERREIRA, A. G. Interferência, competição e alelopatia. In: Ferreira, A. G, Borghetti, F., editores. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 251-262, 2004.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil** – espécies do cerrado. São Paulo: Edgard Blücher. 239 p., 1969.

FIGUEIREDO, M. E. et al. Avaliação química e da atividade antidiarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n.1, jan./mar. 2005.

FREITAS, L. B. et al. Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 9-16, 2015.

FUJII, Y. Screening of allelopathic candidates by new specific discrimination, and assessment methods for allelopathy, and the inhibition of L-DOPA as the allelopathic substance from the most promising velvetbean (*Mucuna pruriens*). **Bulletin of National Institute for Agro-Environmental Sciences**, v. 10, p. 115–218 (in Japanese with English summary). 1994.

FUJII, Y. et al. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. **Weed Biology Management**, v. 3, p. 233–241, 2003.

FUJII, Y. et al. Assessment method for allelopathic affect from leaf litter leachates. **Weed Biology Management**, v. 4, p. 19–23, 2004.

GARCIA, A. A., CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GONÇALVES, T. S. Interações ecológicas e evolutivas entre: Plantas, herbívoros e seus inimigos naturais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 3, p. 1-9, 2016.

GOPI, C.; VATSALA, T. M. In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 12, p. 1215-1219, Jun. 2006.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE). **Revista Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

HERBERT, R. The Biosynthesis of Secondary Metabolites (2nd. ed.). Springer Herbert, R. (1989). **The Biosynthesis of Secondary Metabolites** (2nd. ed.). Springer, Londoner, London. 1989.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal na Amazônia: limites e oportunidades. **Brasília: EMBRAPA – SPI**, 202 p. 1993.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 777 p., 2002.

JUCHEM, F. et al. Potencial alelopático de diferentes extratos de frutos de adubos verdes sobre a germinação de sementes de couve. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

AGROECOLOGIA, 8, 2013, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Porto Alegre/RS, 2013.

JUNQUEIRA, P. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, C. J. F. Cultivo e produção de óleos essenciais de Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) sob influência alelopática de extratos vegetais aquosos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, Nov., 2014.

KHAN, A. L. et al. Assessment of allelopathic potential of selected medicinal plants of Pakistan. **African Journal Biotechnology**, v. 8, p. 1024–1029, 2009.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006.

LARA-NUÑEZ, et al. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 11, p. 2009-2016, 2006.

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

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, v. 2, p. 353, 2008.

MAMEDE, M. C. H. *Byrsonima*. In: REFLORA: **lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008827>>. Acesso em: 25 Jun. 2014.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.736. 2007.

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, 2015

MORIKAWA, C. I. O. et al. Screening of 170 Peruvian plant species for allelopathic activity by using the Sandwich Method. **Weed Biology and Management**. Weed Science Society of Japan. 2012.

MORITA S., ITO M., HARADA J. Screening of an allelopathic potential in arbor species. **Weed Biology and Management**, v. 5, p. 26–30, 2005.

NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

NUNES, J. V. D. et al. Atividade alelopática de extratos de plantas de cobertura sobre soja, pepino e alface. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 1, p. 122 – 130, 2014.

OLIVEIRA, J. S. et al. Germinabilidade de *Myracrodruon urundeuva* sob efeito de extratos foliares alelopáticos. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 26, n. 2, p. 248-254 Abr./Jun. 2014.

OLIVEIRA, L. G. et al. Atividade alelopática de extrato acetato-etílico de folhas de *Solanum cernuum* Vell. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 538-543, 2013.

OLIVEIRA, M. I. B. et al. Sistema reprodutivo e polinização de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 756- 758, jul. 2007.

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

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PERGO, E. M., ISHII-IWAMOTO, E. L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 500-513, 2011.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 169 p. 2002.

PRATES, H. T. et al. Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 909-914, 2001.

POSER, G. L., MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: Simões et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, cap. 4, p. 82, 2004.

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

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed, New York: Academic Press. p. 363, 2012.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall, p. 443-472, 1992.

RIZZO, L. Biossays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Elsevier**. v. 45, p. 4311-4340, 2011.

ROSA, J. M et al. Efeito alelopático de *Salix* spp. sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Raphanus sativus* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 3, p. 255-263, 2013.

SALDANHA, A. A.; SOARES, A. C. Chemical compounds and botanical, ethnobotanical and pharmacological aspects of *Byrsonima verbascifolia* Rich ex. A. Juss. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1000-1006, 2015.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparations and ontioxidant properties of extracts of *Japanese persimmon* leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, p. 569-575, 2004.

SASIDHAREN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Med**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O et al. 30 **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS, v. 82, p. 597-622, 722, 723, 2000.

SILVA, F. M.; ÁQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

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, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta do medicamento**. Florianópolis. Porto Alegre: UFRGS/UFSC. p. 128-129, 2007a.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta do medicamento**. Florianópolis. Porto Alegre: UFRGS/UFSC. p. 232, 316, 2007b.

SIMOES, M. S. et al. Padronizacao 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.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3rd ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2012.

SOUZA, S. A. M. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Belo Horizonte, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology** (3rd ed.). Sinauer Associates, Inc. 2002.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

WINK, M. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. In **ANNUAL Plant Reviews**, 39 (2nd ed.). Blackwell Publishing Ltd, 2010.

ZENG, R. S.; MALLIK, A.U.; LUO, S. **Allelopathy in sustainable agriculture and forestry**. New York: Springer Verlag, 426p. 2010.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO I: Sandwich Method Applied to the Screening of Allelopathic Action in *Byrsonima* spp. (Malpighiaceae) Species**

**AUTORES:** Bárbara Christina Silva Amâncio, Kamilla Pacheco Govêa, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade, Sandro Barbosa.

**Artigo submetido a revista *Brazilian Archives of Biology and Technology***

**ARTIGO II: AÇÃO ALELOPÁTICA DE DIFERENTES EXTRATOS DE FOLHA DE *Byrsonima* spp. (MALPIGHIACEAE) SOBRE BIOTESTE DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

**AUTORES:** Bárbara Christina Silva Amâncio, Kamilla Pacheco Govêa, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade, Thiago Corrêa de Souza, Sandro Barbosa.

**Artigo redigido conforme as normas da revista *Brazilian Journal of Botany***

**ARTIGO I: Sandwich Method Applied to the Screening of Allelopathic Action in *Byrsonima* spp. (Malpighiaceae) Species**

**AUTORES:** Bárbara Christina Silva Amâncio, Kamilla Pacheco Govêa, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade, Sandro Barbosa.

Artigo submetido à **Brazilian Archives of Biology and Technology**



# Sandwich Method Applied to the Screening of Allelopathic Action in *Byrsonima* spp. (Malpighiaceae) Species

## Allelopathy of *Byrsonima* spp.

### ABSTRACT

*In order to understand the allelochemical action of Byrsonima intermedia A. Juss. and Byrsonima verbascifolia Rich. ex A. Juss., the effects on germination, initial growth and cell cycle of Lactuca sativa L., exposed to leaves and fruits of this species, were evaluated using the sandwich method. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). For the parameters germination percentage and germination rate index, no difference between Byrsonima spp. species was observed, and B. intermedia fruits were responsible for the highest inhibition of lettuce germination, compared to the leaves. Root elongation in lettuce exposed to B. verbascifolia organs showed stimulatory effects and B. intermedia organs showed inhibitory effects on root growth. The mitotic index showed the allelopathic effect of Byrsonima spp. by the reduction in cell division in lettuce root meristem, and the stimulus in root elongation was caused by B. verbascifolia, understood as a consequence of cell expansion, not mitotic activity. An aneugenic effect of Byrsonima spp. was observed, and the highest frequency of C-metaphase and stickiness was found in B. verbascifolia fruits and B. intermedia leaves.*

**Keywords:** Allelopathy, Murici-pequeno, Murici-cascudo, Sandwich method

### 1. INTRODUCTION

The Brazilian flora is world renowned for the pharmacological potential of its plants, due to their medicinal properties, in addition to their well-known culinary and toxic properties, attracting the attention of researchers from different areas of knowledge. While much has been studied about the pharmacological and toxicological aspects of Brazilian plants, few studies address the possible ecological interactions that are mediated by secondary metabolites produced by these plants (Santos 2008).

Among the biomes present in the world, Cerrado is the one with the highest plant biodiversity, covering 25% of the Brazilian territory in the states of Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí and Bahia. In these regions, it is possible to highlight livestock and agriculture activities, and often a disorderly extractive and predatory exploitation, making Cerrado the most threatened biome in Brazil, which may cause the extinction of many species of botanical, ecological and pharmaceutical interest, before they are fully known (Vieira and Martins 2000; Araújo et al. 2010).

*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss. and *Byrsonima intermedia* Rich. ex A. Juss., popularly known as Murici-cascudo and Murici-pequeno, respectively, are species native to the Cerrado, belonging to the Malpighiaceae family, with a great medicinal potential. They are used by the local population for the treatment of diarrhea, fever, mucosa infections and Chagas disease, presenting healing, antiseptic, antimicrobial, antihemorrhagic and anti-inflammatory properties (Pinto and Bertolucci 2002, Guillhon-Simplicio and Pereira 2011, Moreira et al. 2011, Saldanha et al. 2013, Saldanha et al. 2016). It produces secondary metabolites in fruits, leaves, and also on the stem bark, such as volatile compounds, glycolipids, triterpenes, saponins, tannins and proanthocyanidins (Figueiredo et al. 2005; Rodrigues 2007, Gonçalves et al. 2013; Pinto and Kolb 2015). The production of secondary metabolites can influence the ecological aspects of the place, the growth and development of other plants and organisms, in a phenomenon known as allelopathy. Studies on the allelopathic effects are already substantial regarding germinal and growth aspects, as well as initial target plant development, but still incipient when the issue is related to the phytotoxic action on the cell cycle behavior and to chromosome complement of bioassays (Silva and Áquila 2006, Reigosa et al. 2013). Understanding plant intervention in the environment, besides the action of compounds

produced by them in plant bioassays, can either subsidize weed control programs that seek to obtain efficient products for the control and/or elimination of weeds without harming the environment (Peres et al. 2009, Zeng et al. 2010), or screening studies of their effects on the cell cycle and DNA (Paula et al. 2015).

The sandwich method is a bioassay used to determine the biological activity of the leachate from medicinal plants, invasive plant species, among others (Fujii 1994, Fujii et al. 2004, Cândido et al. 2010). This method involves inoculating the plant material between two layers of agar, and it is an important tool to investigate the allelopathic potential under laboratory conditions. Agar is used, since it is a substance that allows a better translocation of water-soluble compounds to the test organism (Fujii et al. 2003).

Although Murici-cascudo and Murici-pequeno are species quite widespread and widely exploited in folk medicine, cytogenotoxicity studies of different organs of these species on the dynamics of the nuclear genome of plant bioassays were not found in the literature. Therefore, the study of phyto and cytogenotoxic properties of leaves and fruits of these plants can diagnose the allelopathic capacity and assist in screening their possible effects on cell proliferation and chromosome complement, contributing to pharmacological studies.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Collection and Preparation of Samples**

Fully expanded leaves and fruits of *B. intermedia* and *B. verbascifolia* were collected from populations located in the municipality of Ijaci-MG. Plants of these populations were identified, cataloged, and specimens are in the ESAL Herbarium, Department of Biology UFLA under registration No. 17601 and No. 17228, respectively. The material collected in August 2014, during dry season, was placed in plastic bags and transported to UNIFAL-MG on the same day of collection. The organs were sorted, separated, dried in an oven at 40°C with forced air circulation, subsequently crushed and sieved (0.84mm opening).

### **2.2 Phytotoxicity Tests – Sandwich Method**

The methodology used in this experiment was the same used by Cândido et al. (2010), with leaves and fruits of the two *Byrsonima* spp. species.

*Lactuca sativa* L. seeds, cultivar Grand Rapids, obtained commercially, were used as bioassays. 30 seeds were distributed in Petri dishes containing a 5 mL layer of agar (0.5%), followed by the addition of 10, 20, 30, 40 and 50 mg plant dry matter, subsequently adding one more 5 mL layer of agar. In the control treatment, no plant material was added to the agar.

The dishes were kept in a B.O.D. camera at 20°C with a 12-hour photoperiod. Daily germination assessments were performed until the seventh day after the plot of the experiment. The following parameters were evaluated: germination percentage (%G) 24 hours after the plot of the experiment, germination rate index (GRI), number of normal seedlings (NS), root elongation (RE), shoot length (SL), fresh biomass (FB), dry biomass (DB), mitotic index (MI) and chromosomal abnormalities (CA).

In each dish, ten seedlings were randomly selected for analysis of RE and SL, and the measurements were performed on the seventh day after the beginning of the experiment, with the aid of a digital caliper (DIGIMESS® 150mm) (Barnes and Soeiro 1981). For FB and DB, data were obtained according to Moraes et al. (2015).

### **2.3 Cytogenetic Analyses**

Concomitantly to germination and initial growth tests, mitotic index (MI) assessments, as well as the occurrence of chromosomal abnormalities (CA), were conducted. For this experimental condition, *L. sativa* seeds were placed under the same conditions described above. After root protrusion, root tips were collected, fixed in Carnoy (ethanol:acetic acid, 3:1 v/v) and stored at -18°C. After 24 hours, the

Carnoy was exchanged, and cytogenetic preparations were made, as described by Rodrigues et al. (2013).

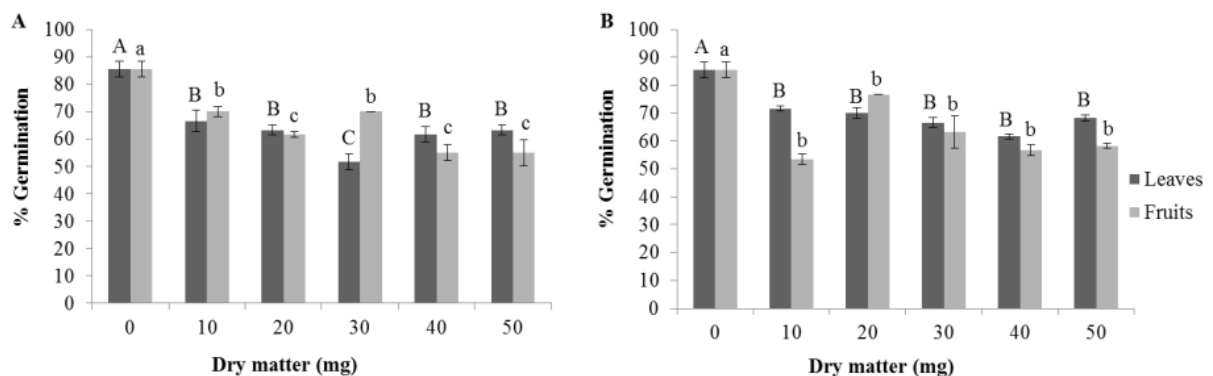
The criteria for the acceptance of the presence of chromosomal alterations observed are described as follows: micronucleus, bridge in anaphase, bridge in telophase, C-metaphase, stickiness and laggard chromosome.

## 2.4 Data Analysis

The experimental design was completely randomized (CRD) in a factorial design with three repeat, in 2x2x5, with 2 species (*B. intermedia* and *B. verbascifolia*), 2 organs (leaf and fruit), 5 treatments (10, 20, 30, 40 and 50 mg) and the negative control. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared by the Scott-Knott test at 5% significance, using the Sisvar program, version 5.4 (Ferreira 2014).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

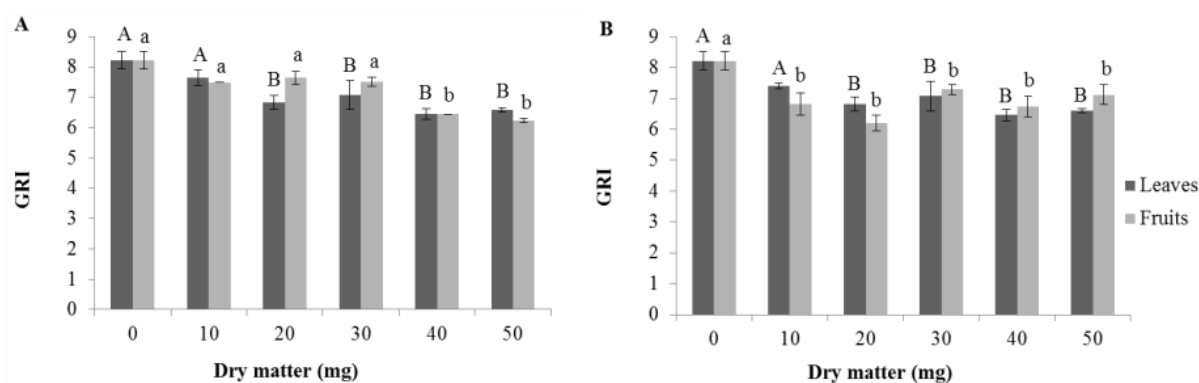
There was no significant difference ( $p>0.05$ ) between *Byrsonima* spp. species regarding lettuce germination percentage (%G). However, when compared with the negative control and the treatments, it is possible to observe that, from 10 mg of leaves and fruits, both species reduced %G (Figure 1). Furthermore, a statistical difference ( $p>0.05$ ) was found for leaves and fruits of *Byrsonima intermedia*, and the fruits inhibited about 7% germination in relation to leaves.



**Figure 1.** Germination percentage (%G), with 24 hours, of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Equal letters between concentrations do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p>0.05$ ); uppercase and lowercase letters refer to the statistical analysis of leaves and fruits, respectively, for each *Byrsonima* sp species.

In the literature, phytochemical screening studies that allow the quantitative comparison of the product of secondary metabolism of fruits for this species were not found, and only the presence and quantification of flavonoids, catechins and tannins in leaves was described (Rodrigues 2007, Moreira et al. 2011).

A similar behavior of %G was observed for germination rate index (GRI), showing a lower GRI in seeds exposed to treatments of leaves and fruits of *Byrsonima* spp., when compared to the control (Figure 2).

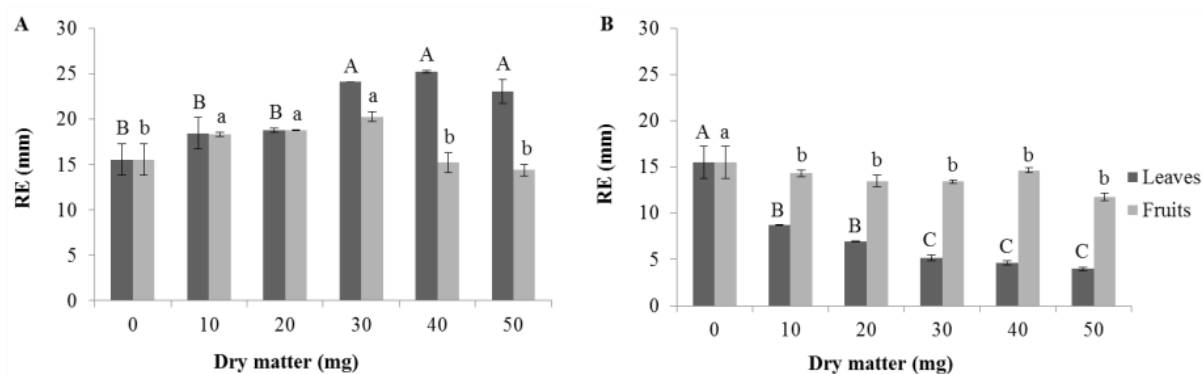


**Figure 2.** Germination Rate Index of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Equal letters between concentrations do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p > 0.05$ ); uppercase and lowercase letters refer to the statistical analysis of leaves and fruits, respectively, for each *Byrsonima* sp species.

These results are consistent with studies showing that species from the Cerrado, especially those with saponins and triterpenoids as secondary metabolic products, present phytotoxic activity on lettuce germination (Barbosa et al. 2008, Novaes et al. 2013). Saponins have recognized biological activity, mainly affecting germination and initial growth parameters, since they reduce the respiration rate of seeds due to the reduced availability of oxygen diffusion through the seed coat (Marchaim et al. 1974). Triterpenes also act as lettuce germination inhibitors, but the mechanism of action of these compounds is still unknown (Martins et al. 2010). In addition, the delay or reduction in germination by phytotoxicity can be explained by the effects on the mobilization of reserves, which occurs in the initial stages of seed germination, by the action of secondary metabolites (Pinto and Kolb 2015).

The parameters shoot length (SL), number of normal seedlings (NS) and dry biomass (DB) showed no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between species, organs and quantity of leaves and fruits of *Byrsonima* spp.

Root elongation (RE) of lettuce exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp., ranged as a function of species and organs. *B. verbascifolia* organs (Figure 3A) showed stimulatory effect on root growth, compared to the control, and it was more evident in treatments 10, 20 and 30 mg of fruits and in treatments with larger amounts of leaves (30, 40 and 50 mg). On the contrary, leaves and fruits of the species *B. intermedia* (Figure 3B) inhibited RE, particularly from 30 mg (dry matter) leaves.



**Figure 3.** Root elongation (mm) of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Equal letters between concentrations do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p > 0.05$ ); uppercase and lowercase letters refer to the statistical analysis of leaves and fruits, respectively, for each *Byrsonima* sp species.

In studies on allelopathic activity through the sandwich method, Fujii et al. (2003, 2004) also found that some species of the families Asteraceae, Fabaceae, Sapotaceae and Malvaceae promoted stimulation, and others belonging to the same family promoted an inhibitory effect on lettuce root length. The concept of allelopathy, according to Rice (1984), involves both inhibitory and stimulatory effects on the target organism. Stimulatory effects associate to substance concentrations, manifesting most often in situations of low concentrations, can affect membrane permeability and, at high concentrations, inhibit the absorption of water and nutrients (Einhellig, 2002).

In this study, the stimulatory effects of *B. verbascifolia* fruits in lower amounts tested, corroborate the results of Einhellig (2002); however, treatments with leaves of this species showed a differing response, with stimulatory effects at 30, 40 and 50 mg dry matter. Changes in the activity of expansins, enzymes involved in the cellular expansion process, may be, as reported by Moraes et al. (2015), a possible explanation for an abnormal root growth, when exposed to *B. verbascifolia* leaves.

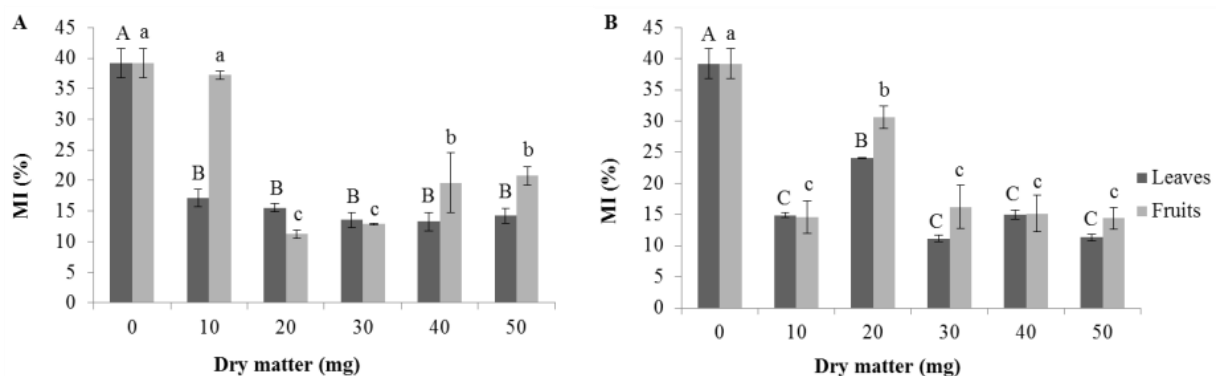
For *B. intermedia*, there was a significant decrease in RE with the increase in the amount of dry matter of leaves, and this is probably due to the presence and amount of secondary metabolites in this organ. According to the literature, anthraquinones, glycolipids, triterpenes, saponins, tannins and proanthocyanidins are compounds found in this species and the phytotoxic activity of these metabolites, acting alone or synergistically, influence the initial growth of the target plant (Figueiredo et al. 2005, Rodrigues 2007, González-Coloma et al. 2011, Gonçalves et al. 2013, Paula et al. 2015). It has been proposed that the inhibitory effect of saponins on RE is associated with the formation of high molecular weight arrays around the radicle, preventing water absorption by the plant (Waller et al. 1999).

According to Cândido et al. (2010), allelochemicals can often influence RE, but they may not affect shoot growth, which was observed in this study, due to the fact that absorption happens in root tissues, which are in direct contact with the plant substrate by the agar. Agar is used, since it is a substance that allows a better passage of water-soluble compounds to the target species (Fujji et al. 2003).

For the parameter fresh biomass (FB), there were significant differences between species, and *B. verbascifolia* had a lettuce seedling mass of 17.17%, higher than *B. intermedia*, corroborating the data that showed the stimulus in RE due to the treatment with *B. verbascifolia*. This difference in FB values are probably related to the water content present in target plant tissues (Borella et al. 2012), resulting from the action of treatments with different *Byrsonima* spp. species. However, the effects caused on root length did not extend to significant changes in the dry biomass of lettuce seedlings, which are similar to the results found by Borella et al. (2012). According to Gatti et al. (2004), this response may be related to a differentiated organic matter investment in roots and shoots, directly influenced by the tested compounds.

In addition to the evaluated phytotoxicity parameters, it was possible to observe a root tip browning in the bioassay, which were in contact with the leaves and fruits of the *Byrsonima* spp. species, showing a possible necrosis. According to Periotto et al. (2004), root browning can also be a sign of phytotoxicity, as in the case of *B. verbascifolia* and *B. intermedia*.

Regarding the parameters that show cytotoxicity, treatments with different organs of the two species reduced cell division, when compared to the control, and this reduction is more evident in bioassays exposed to *Byrsonima* spp. leaves (Figure 4).

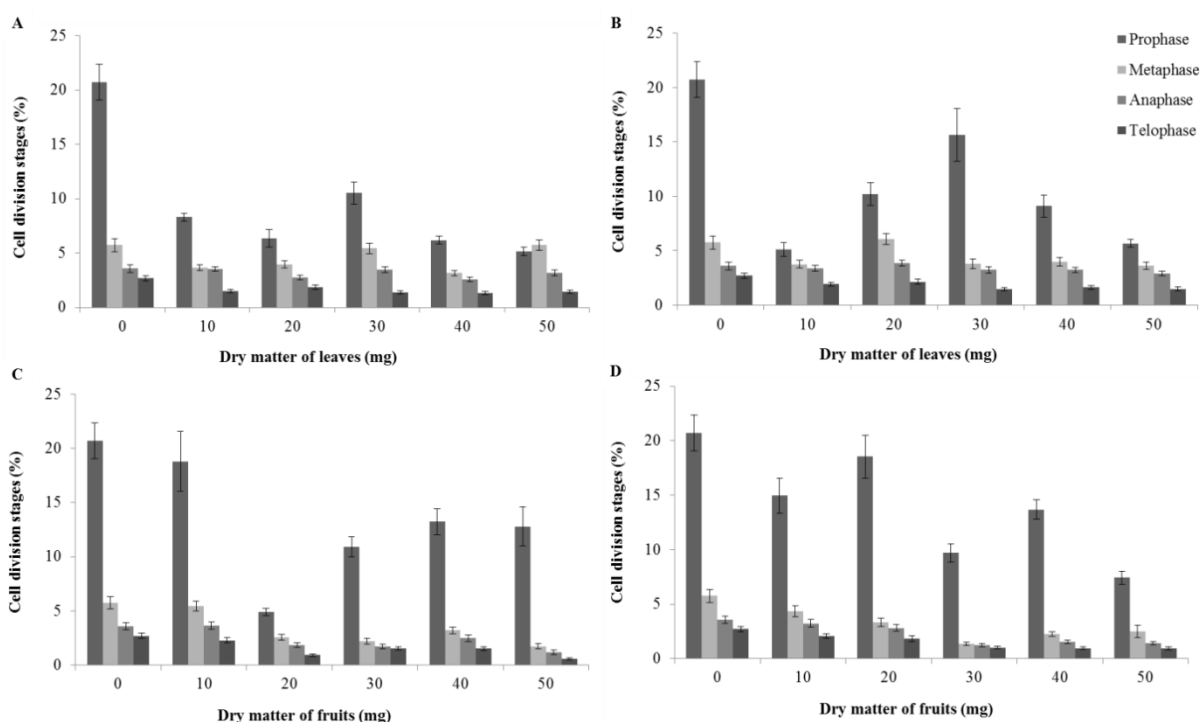


**Figure 4.** Mitotic index (%) of root tips of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Equal letters between concentrations do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p > 0.05$ ); uppercase and lowercase letters refer to the statistical analysis of leaves and fruits, respectively, for each *Byrsonima* sp. species.

The mitotic index (MI) showed the allelopathic effect of *B. verbascifolia* by reduced cell division in lettuce meristematic cells, compared to the control. Inversely, RE data for this species showed a stimulus in root growth, and may be understood as a root growth, which is not caused by mitotic activity, but by cell expansion growth, as previously mentioned. For *B. intermedia*, the treatments also reduced cell division, which is the likely cause of the inhibitory effects on germination and root

growth of lettuce observed in this study. The visible effects on germination and initial growth of the target plants are widely cited in the literature as secondary manifestations of changes that occur at the cellular and molecular level, such as inhibition of mitosis and/or changes in chromosomes, structure and nuclear dynamics (Ferreira and Áquila 2000, Andrade et al. 2008). According to Leme & Marin-Morales (2009), the effects on cell proliferation are important in the assessment of cytotoxicity. It is known, for example, that phenolic compounds can inhibit root development and cell division, causing stunted growth (Li et al. 2010).

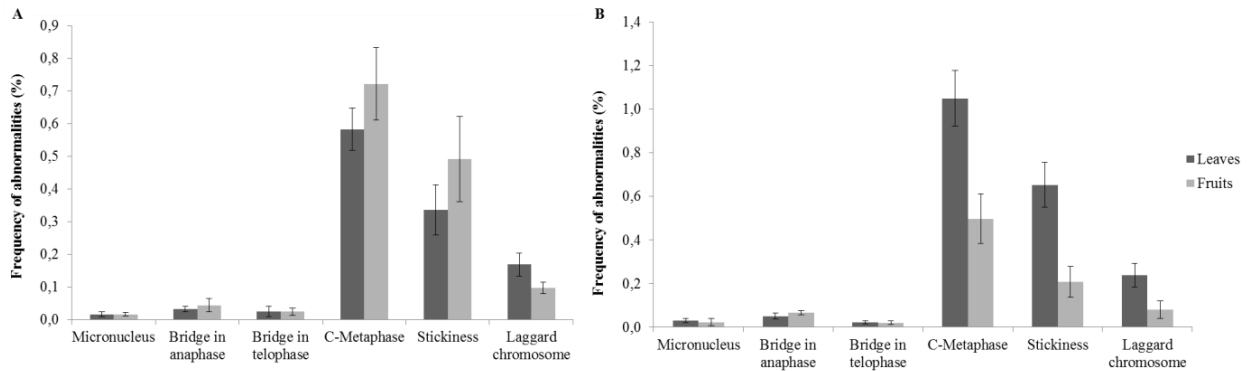
The cytotoxic effect of the fruits and especially the leaves of *Byrsonima* spp. can also be verified by the inhibition in the number of cells entering prophase and, consequently, by the reduction in the number of cells in other phases of the cell cycle, compared to the control, as found in this study (Figure 5).



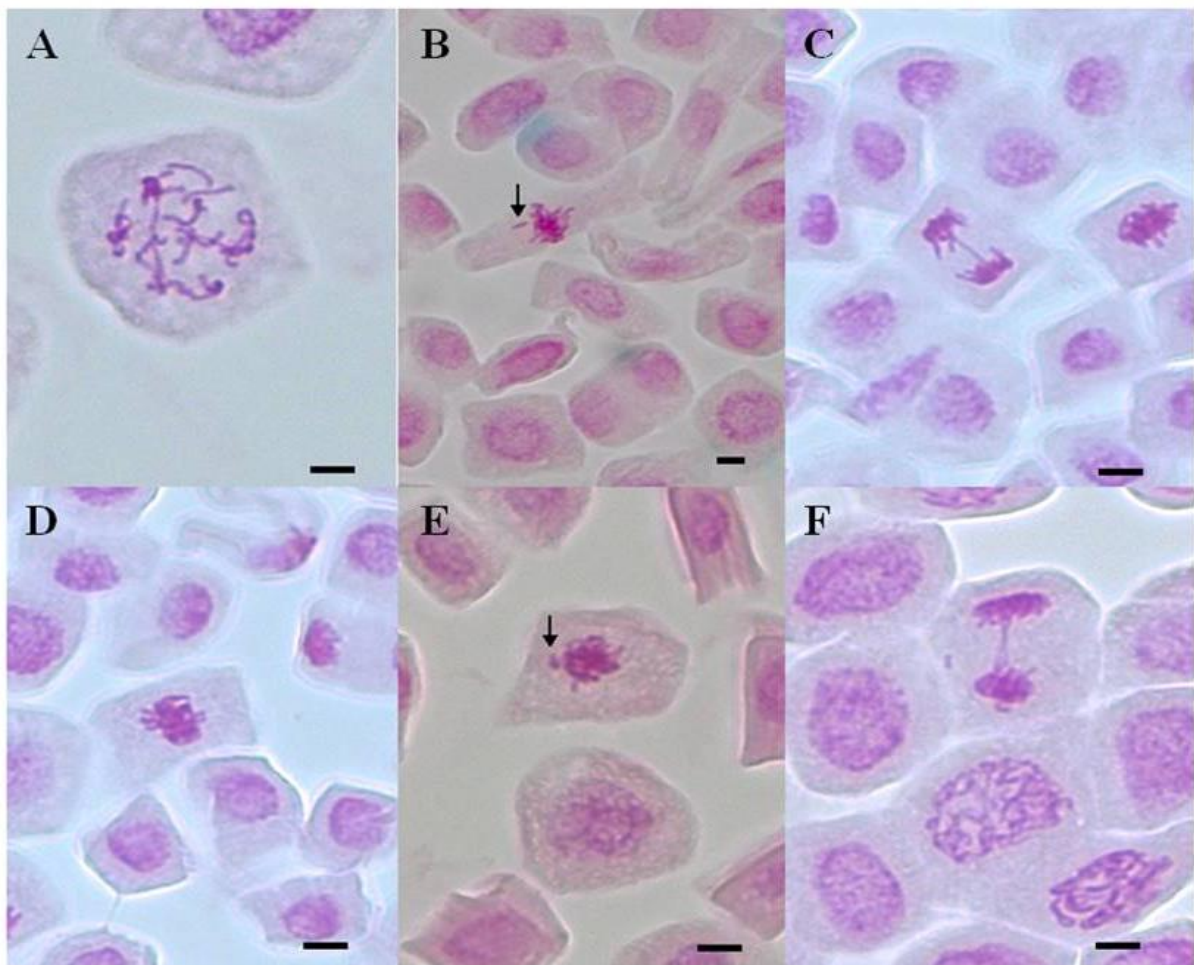
**Figure 5.** Cell division stages (%) of root tips of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A and C) *B. verbascifolia*. B and D) *B. intermedia*.

Paula et al. (2015) observed the inhibitory effect of *Bauhinia unguolata* L. extracts on the different phases of mitosis, and the highest inhibition was observed in the number of cells in anaphase. According to these authors, the predominance of inhibitory effects on the different stages of mitosis in root lettuce meristem cells often leads to a reduction in growth, given that the meristematic region is responsible for the production of new cells and it is closely related to root growth. This result could be observed in treatments with *B. intermedia*. However, for *B. verbascifolia*, there is no link between the reduction in the number of dividing cells with root growth.

The occurrence of chromosomal abnormalities (CA) observed in the bioassays exposed to leaves and fruits of both *Byrsonima* spp. species includes micronucleus, bridge in anaphase, bridge in telophase, C-metaphase, stickiness and laggard chromosome (Figures 6 and 7).



**Figure 6.** Frequency of chromosomal abnormalities (%) of root tips of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*.



**Figure 7.** Chromosomal abnormalities in root tips of *Lactuca sativa* L. exposed to leaves and fruits of *Byrsonima* spp. A) C-metaphase; B) Laggard chromosome (arrow); C) Bridge in anaphase; D) Stickiness; E) Micronucleus (arrow); F) Bridge in telophase. Bar = 5  $\mu$ m.

According to Leme and Marin-Morales (2009), chromosomal abnormalities indicating clastogenic effects are those with bridges and chromatid breaks; while those resulting from aneugenic effects are loss and delay of chromosomes, stickiness, multipolar nucleus and C-metaphase. Thus, in this study, the cytogenetic analysis showed an aneugenic effect of *Byrsonima* spp. species, since the most frequent CA were C-metaphase and stickiness, with the highest frequencies observed in bioassays exposed to *B. verbascifolia* fruits and *B. intermedia* leaves. The highest rate of C-metaphase (2%) and

stickiness (1.08%) was observed in cells treated with 20 mg of *B. intermedia* leaves (data not shown). Characterized by chromosomes spread in the equatorial zone of the cell, C-metaphase shows changes in the mitotic spindle and chromosome structure, and these changes are indicative of the action of the toxic agent on spindle fibers, preventing the continuation of the mitotic cycle (Leme and Marin Morales 2009). As a result, the cell cycle is interrupted in metaphase and chromosomes are seen scattered and condensed with clear centromeres (Fiskejö 1985, Andrade-Vieira 2014). In studies with *Plectranthusamboinicus* leaves, Pinheiro et al. (2015) attributed high stickiness rates to the toxic effects of chemical agents on the organization of chromatin. Therefore, the high percentage of stickiness reflects the genotoxic effect of *Byrsonima* spp., since this CA represents a loss in the normal characteristics of the chromosome, resulting in the formation of agglomerates and condensation (Andrade-Vieira et al. 2013).

#### 4. CONCLUSIONS

The sandwich method is an efficient technique to characterize the allelochemical action of the dry matter from the studied *Byrsonima* spp. organs. Through the simultaneous survey of phytotoxicity and cytogenotoxicity of leaves and fruits of *B. verbascifolia* and *B. intermedia*, antagonistic effects of these species on the growth of lettuce roots was observed. *B. intermedia* leaves inhibited lettuce root elongation, while *B. verbascifolia* leaves stimulated it. The mitotic index showed an allelopathic effect of *Byrsonima* spp. by the reduction in cell division in lettuce root meristem, and the stimulus in root elongation was caused by *B. verbascifolia*, understood as a consequence of cell expansion, not mitotic activity. Aneugenic effects were observed by chromosomal abnormalities, with the highest frequency of C-metaphase and stickiness in *B. verbascifolia* fruits and *B. intermedia* leaves.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the postdoctoral fellowship PNPd to Dra. Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support.

#### 6. REFERENCES

- Andrade DAV, Ortolani FA, Moro JR, Moro FV. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae - Fabaceae). *Acta Bot Bras.* 2008;22(3):621-625.
- Andrade-Vieira LF, Botelho CM, Laviola BG, Palmieri MJ, Praca-Fontes MM. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. *An Acad Bras Ciênc.* 2014;86(1):373-382.
- Araújo JA, Azevedo AA, Silva LC, Meira RMS. Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). *Plant Syst Evol.* 2010;(286):117-131.
- Barbosa EG, Pivello VR, Meirelles ST. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian Cerrados. *Braz Arco Biol Technol.* 2008;(51):625-631.
- Borella J, Wandscheer ACD, Bonatti LC, Pastorini L. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. *Rev Bras Biociênc.* 2012;7(3):260-265.
- Cândido ACS, Dias ACR, Serra AP, Christoffoleti PJ, Scalon SPQ, Pereira MTL. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduíche. *Rev Bras Biociênc.* 2010;8(3):268-272.
- Einhellig FA. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: Putnam AR, Tang CHS. (ed.). *The Science of Allel.* Nova York: John Wiley and Sons. 1986;171-188.
- Einhellig FA. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M. & PEDROL, N. *Allel Mol to Ecos.* 2002;1-23.



Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest Biochem Physiol.* 2007;(88):252-259.

Ferreira AG, Áquila MEA. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Rev Bras Fisiol Veg.* 2000;(12):175-204.

Ferreira DF. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc Agrotec, Lavras.* 2014;38 (2):109-112.

Figueiredo ME, Michelin DC, Sannomiya M, Silva MA, Dos Santos LC, Almeida LFR, et al. Avaliação química e da atividade antidiarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). *Braz J Pharm Sci.* 2005; 41(1):79-83.

Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* 1985;(102):99-112.

Fujii Y. Screening of allelopathic candidates by new specific discrimination, and assessment methods for allelopathy, and the inhibition of L-DOPA as the allelopathic substance from the most promising velvetbean (*Mucuna pruriens*). *Nat. Inst. Agro-Environ.* 1994;(10):115–218.

Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biol.* 2003;(3):233–241.

Fujii Y, Shibuya T, Nakatani K, Itani T, Hiradat E S, Parve ZMM. Assessment method for allelopathic affect from leaf litter leachates. *Weed Biol.* 2004;(4):19–23.

Gatti AB, Perez SCJG, Lima MIS. Efeito alelopático de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raparus sativus* L. *Acta Bot Bras.* 2004;18(3):459-472.

Gonçalves CA, Siqueira JM, Carollo CA, Mauro MO, Davi N, Cunha-Laura AL, et al. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. *J Ethnopharmacol.* 2013;(150):843- 850.

González-Coloma A, López-Balbosa C, Santana O, Reina M, Fraga BM. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem Rev.* 2011; 10(2):245–260.

Guilhon-Simplicio F, Pereira MM. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Quím Nova.* 2011; 34(6):1032-1041.

Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res.* 2009;(682):71-81.

Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules.* 2010;(15):8933-8952.

Moreira, LQ, Vilela FC, Orlandi L, Dias DF, Santos AL, Da Silva MA, et al. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;138(2):610-5.

Moraes RM, dos Santos Filho PR, Carvalho M, de Lima Nogueira M, Barbosa, S. (2015). Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. *Rev Bras Biocienc.* 2015;13(2)

Novaes P, Molinillo JMG, Varela RM, Macías, FA. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savana) plants. *Phytochem Rev.* 2013;12(4):839–855.

Paula C, Cantell V, Silva C, Miguel O, & Miguel M. Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguilata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2015; 17(4),577-584.

Peres MTLP, Mapeli AM, Faccenda O, Gomes AT, Honda NK. Allelopathic potential of orsellinic acid derivatives. *Braz Arch Biol Technol. Curitiba.* 2009;(52):1019-1026

Periotto F, Perez SCJGA, Lima MIS. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta Bot Bras. 2004; 18(3):425-430.

Pinheiro PF, Costa AV, Alves TDA, Galter I N, Pinheiro CA, Pereira AF, et al. Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. J Agric Food Chem. 2015; 63(41):8981-8990.

Pinto JEBP, Bertolucci SKV. Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: FAEPE/UFLA. 2002;169.

Pinto GFS, Kolb RM. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savanna. Botany. 2015; 94(999):1-9.

Reigosa M, Gomes AS, Ferreira AG, Borghetti F. Allelopathic research in Brazil. Acta Bot Bras. 2013; 27(4):629-646.

Rice EL. Allelopathy. 2a ed. New York: Academic Press. 1984;363.

Rodrigues CM. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 197. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”: Araraquara; 2007.

Rodrigues LCA, Barbosa S, Pazin M, Maselli BS, Beijo LA, Kummrow F. 2013. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade de água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. R Bras Eng Agríc Amb, 2013; 17(10): 1099–1108.

Rustenbil JW, Poortvliet TCW. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. Environ Toxicol Chem. 1992;(11):1615-1625.

Saldanha AA, de Siqueira JM, Castro AHF, de Azambuja Ribeiro RIM., de Oliveira FM, de Oliveira Lopes D et al. Anti-inflammatory effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves: Mechanisms involving inhibition of tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E 2 production and migration of polymorphonuclear leucocyte in vivo experimentation. Int Immunoph, 2016; (31): 123-131.

Saldanha AA, do Carmo LF, de Siqueira JM, Castro AHF, de Matos NA, Klein A, et al. Análise fitoquímica preliminar e avaliação do possível efeito antiinflamatório da fração enriquecida em flavonóides de *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). BBR-Bioch Biotec Repo. 2013;89-91.

Santos GC, Paiva R, Paiva PD, Paiva E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. Magistra. 2008;20(1):22-29.

Silva FM, Áquila MEA. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Acta Bot Bras. 2006;20(1):61-69.

Vieira RF, Martins VM. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. Rev Bras Plantas Med. 2000;3(1):13-36.

Waller GR, Yang CF, Chen LF, Su CH, Liou RM, Wu SC, et al. Saponins produced during the life cycle of mung beans and their role as allelochemicals. In Studies in plant science,(6): advances in plant glycosides, chemistry and biology. Edited by C R. Yang, and O. Tanaka. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 1999;105–130.

Zeng RS, Mallik AU, Luo S. Allelopathy in sustainable agriculture and forestry. New York: Springer Verlag. 2010; 426.

**ARTIGO II: AÇÃO ALELOPÁTICA DE DIFERENTES EXTRATOS DE FOLHA DE *Byrsonima* spp. (MALPIGHIACEAE) SOBRE BIOTESTE DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

**AUTORES:** Bárbara Christina Silva Amâncio, Kamilla Pacheco Govêa, Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade, Thiago Corrêa de Souza, Sandro Barbosa.

**Artigo redigido conforme as normas da revista *Brazilian Journal of Botany***

## **AÇÃO ALELOPÁTICA DE DIFERENTES EXTRATOS DE FOLHA DE *Byrsonima* spp. (MALPIGHIACEAE) SOBRE BIOTESTE *Lactuca sativa* L.**

BÁRBARA CHRISTINA SILVA AMÂNCIO<sup>1</sup>, KAMILA PACHECO GOVÊA<sup>1</sup>, LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO TRINDADE<sup>1</sup>, THIAGO CORRÊA DE SOUZA<sup>1</sup>, SANDRO BARBOSA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade / Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais / ICN-Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, Brasil.  
Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Prédio V, Sala 003. Centro. Alfenas – MG.  
[ba\\_amancio@yahoo.com.br](mailto:ba_amancio@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

*Byrsonimaverbascifolia* e *Byrsonima intermedia* são espécies utilizadas na medicinal popular e gastronomia brasileira devido às propriedades farmacológicas de seus metabólitos secundários e nutricionais. Porém, pouco se conhece sobre a ação e atributos desses metabólitos nas interações ecológicas dessas plantas bem como os seus possíveis efeitos citogenotóxicos. Nesse contexto, foi objetivo deste trabalho averiguar a fitotoxicidade de extratos foliares de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* em bioensaio com *Lactuca sativa* L. Extratos aquosos (frio e quente) e extrato etanólico de folhas foram obtidos na concentração de 5% (p/v) e posteriormente preparadas soluções nas concentrações 20, 40, 60, 80 e 100%. Foram avaliados: percentual de germinação, índice de velocidade de germinação, número de plântulas normais, alongamento de raiz, comprimento de parte aérea, biomassa fresca e seca, índice mitótico e anormalidades cromossômicas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os resultados apresentados evidenciam que os extratos foliares de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* possuem potencial fitotóxico e citotóxico. Esses efeitos diferem em função da forma de extração em que extrato etanólico apresentou maior toxicidade independente da espécie. Para a maioria dos parâmetros analisados não houve diferença estatística entre as espécies, porém para número de plântulas normais *B. verbascifolia* foi mais tóxica e para alongamento de raiz *B. intermedia* apresentou maior toxicidade. Entre as anormalidades cromossômicas C-metáfase e *stickiness* foram as mais frequentes indicando efeito aneugênico de extratos foliares de *Byrsonima* spp.

**Palavras chave:** Citotoxicidade, extrato aquoso, extrato etanólico, fitotoxicidade.

## 1 Introdução

O gênero *Byrsonima* Rich. ex A. Juss. é um dos mais representativos da família Malpighiaceae com aproximadamente 150 espécies e ampla distribuição neotropical (DAVIS & ANDERSON, 2010), sendo 50% dessas espécies encontradas em território brasileiro (MAMEDE, 2014). Entre essas espécies destacam-se *Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss. e *Byrsonima intermedia* A. Juss, conhecidas como Murici-cascudo e Murici-pequeno, respectivamente, as quais são bastante exploradas na medicina popular devido a ação farmacológica de seus constituintes químicos que têm atividade antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarreica, cicatrizante, anti-inflamatória e antimutagênica (GUILHON-SIMPLICIO & PEREIRA, 2011; GONÇALVES *et al.* 2013). Na composição química de suas folhas são encontrados proantocianidinas, taninos, triterpenos, quercetina, derivados gálicos, catequínicos, saponinas e cumarinas (GUILHON-SIMPLICIO & PEREIRA, 2011; CECÍLIO *et al.* 2012; SALDANHA & SOARES, 2015).

Os metabólitos secundários das plantas são vitais em suas interações ecológicas permitindo desenvolvimento e sobrevivência das espécies, pois conferem proteção contra predadores e microrganismos patogênicos (SINKKONEN, 2006). Também funcionam como compostos alelopáticos por meio da interação bioquímica entre vegetais no meio ambiente, impedindo a germinação e influenciando no crescimento e desenvolvimento de outras plantas (SILVA & ÁQUILA, 2006; REIGOSA *et al.* 2013). Guilhon-Simplicio, Pereira (2011) relatam que os aleloquímicos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, contudo, em *Byrsonima* spp há um número cada vez mais crescente de trabalhos que utilizam folhas como principal fonte dessas substâncias (FIGUEIREDO *et al.* 2005; MOREIRA *et al.* 2011; GONÇALVES *et al.* 2013, PINTO & KOLB, 2015).

O processo de extração de substâncias do metabolismo secundário pode ocorrer por diversas técnicas. A diferença nos processos está relacionada aos tipos de solventes, por

exemplo água ou etanol, e à temperatura de extração, que pode ser a frio ou a quente, levando em consideração os compostos alvos, sendo assim necessária a adequação nos métodos de extração (SASIDHAREN *et al.* 2011). A água é um dos solventes mais importantes, sendo utilizada na extração de substâncias hidrofílicas, com destaque para aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, saponinas, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. A vantagem da extração por meio de etanol é a retirada de substâncias ativas como gomas, resinas, alginatos, além de ser um meio desfavorável à propagação microbiana (SIMÕES *et al.* 2007).

As interações planta/planta no meio ambiente bem como a atividade de compostos por elas produzidos podem ser investigadas por meio de bioensaios vegetais, os quais constituem um método para medição da resposta de organismos expostos a diferentes amostras, realizados em laboratórios sob condições específicas e controladas (SOUZA FILHO *et al.* 2011). As informações obtidas nesses experimentos podem subsidiar programas de controle de plantas daninhas que visam obter produtos eficientes no controle e/ou eliminação de invasoras sem causar danos ao ambiente (OLIVEIRA *et al.* 2015) quanto estudos de triagem dos seus efeitos sobre o ciclo celular e o DNA (Paula *et al.* 2015). O uso de *Lactuca sativa* L. como planta-alvo nos estudos alelopáticos reside na sensibilidade da espécie para expressar os resultados mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos. Além disso, a espécie apresenta outras peculiaridades que favorecem sua utilização, como: germinação rápida em aproximadamente 24h, crescimento linear em ampla faixa de variação de pH e potenciais osmóticos, e características citogenéticas como cromossomos grandes e em número reduzido que facilitam as análises citológicas (SIMÕES *et al.* 2013; MOUSAVI *et al.* 2013).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade alelopática e citogenotóxica de diferentes extratos de folhas de *B. verbascifolia* e *B. intermedia* em bioensaio com *Lactuca sativa* L. contribuindo para a caracterização quimioecológica e farmacológica do gênero *Byrsonima*.

## 2 Material e métodos

**Coleta e preparo das amostras** - Folhas totalmente expandidas de *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* foram coletadas em populações localizadas no município de Ijaci-MG, sul de Minas Gerais, Brasil (21°11.038'S; 44°56.825'W e altitude 890m; 21°09.995'S; 44°55.671'W e altitude 839m, respectivamente). Plantas destas populações foram identificadas, catalogadas e as exsiccatas encontram-se no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras sob os registros n°17.601 e n°17.228, respectivamente. O material foi coletado em agosto de 2014, época de seca, acondicionado em sacos plásticos, e transportado no mesmo dia das coletas para a UNIFAL-MG. As folhas foram triadas, separadas, secas em estufa a 40°C com circulação de ar forçada até estabilização da massa, posteriormente trituradas e tamisadas.

**Preparo dos extratos** - Os extratos aquosos (frio e quente) de folhas foram obtidos na concentração de 5% (p/v), conforme Giotto, Oliveira e Silva (2007). A extração a quente consistiu na adição de folhas trituradas em água destilada na temperatura de 90° C e, ao atingir a temperatura ambiente, os extratos foram filtrados em papel filtro, obtendo-se a solução estoque (100%). Para a extração a frio, o mesmo procedimento foi seguido, no entanto, a água destilada encontrava-se em temperatura ambiente e posteriormente a solução foi colocada a 4° C por 24 horas. O extrato etanólico (5%) foi preparado por maceração até a exaustão total de acordo com os procedimentos descritos por Ferreira, Souza & Faria (2007), mantido em temperatura ambiente até ser dissolvido em água destilada para obtenção da solução estoque (100%).

A partir das soluções estoque dos extratos aquosos (frio e quente) e extrato etanólico, foram obtidas as concentrações 20, 40, 60 e 80%, conforme descrito por Santos *et al.* (2015) para condução dos bioensaios de fitotoxicidade e citotoxicidade.

Foram aferidos o pH e o potencial osmótico de todos os extratos (Pinto & Kolb 2015) com o objetivo de eliminar as interferências no bioensaio.

**Ensaio de fitotoxicidade** - Foram utilizadas 30 sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids, em placas de Petri (90x60cm) contendo duas folhas de papel Germitest<sup>®</sup>, com diferentes concentrações de extratos aquosos e etanólico (20, 40, 60, 80 e 100%) e água destilada como controle (0%). O material foi mantido em câmara tipo B.O.D., a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas. Foram avaliados: porcentagem de germinação (%G) 24h e 48h após a plotagem do experimento, índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas normais (NP), alongamento de raiz (AR), comprimento de parte aérea (CPA), biomassa fresca (BF), biomassa seca (BS). A determinação do IVG foi realizada conforme Chiapusio *et al.* (1997). Para avaliação do AR e CPA foram selecionadas dez plântulas em cada placa, sendo as medidas realizadas no sétimo dia de germinação com o auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS<sup>®</sup> 150mm). Para BF e BS os dados foram obtidos de acordo com Moraes *et al.* (2015).

**Análises citogenéticas** - Foram conduzidas concomitantemente aos ensaios de fitotoxicidade as avaliações citogenotóxicas, em que sementes de *L. sativa* foram colocadas nas mesmas condições experimentais anteriormente descritas. Após a protrusão radicular foram coletadas pontas de raiz, fixadas em Carnoy e armazenadas a -18°C. As preparações citológicas foram confeccionadas pelo método de esmagamento conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2012). Foram avaliadas 6000 células/tratamento para determinação do índice mitótico e ocorrência de anormalidades cromossômicas. As alterações cromossômicas quantificadas foram: micronúcleo, ponte em anáfase, ponte em telófase, C-metáfase, *stickiness* e cromossomo perdido.



*Análise de dados* - Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, sendo 2x3x5, ou seja, duas espécies (*Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia*), 3 formas de extração (aquoso frio, aquoso quente e etanólico), 5 concentrações (20, 40, 60, 80 e 100%) e o controle negativo (0%). Os dados 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 5.4 (Ferreira 2014).

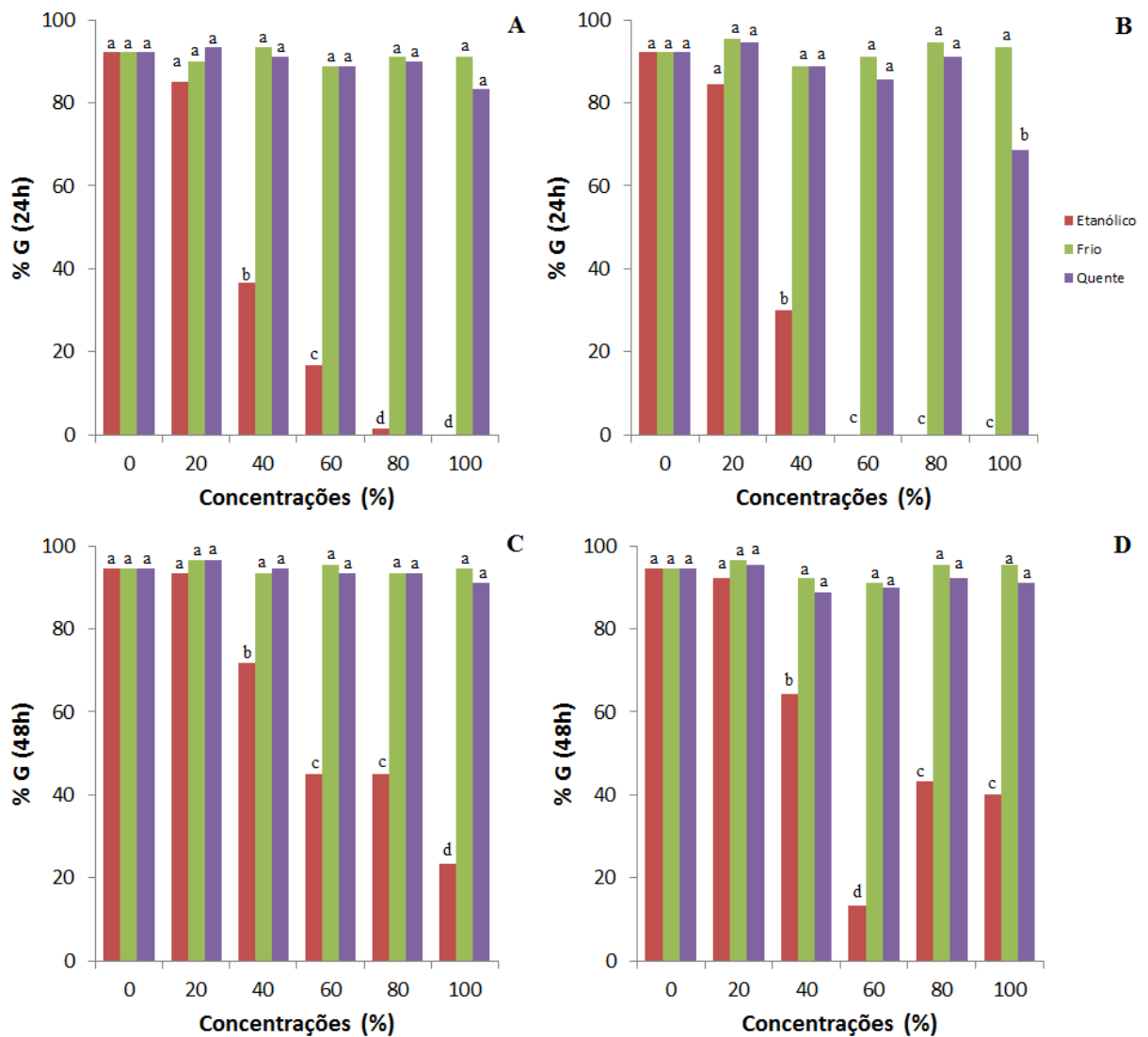
### 3. Resultados

**3.1 Características físico-químicas dos extratos** - Os níveis de pH nos extratos de *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* variou de 3,55 a 5,53, ao passo que o potencial osmótico das espécies variou de -0,10 a -0,19 MPa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características físico-químicas dos extratos de folhas de *Byrsonima* spp

Espécie	Extrato	pH	Potencial osmótico
<i>B. verbascifolia</i>	Aquoso Frio	5,53	-0,182
	Aquoso Quente	5,44	-0,173
	Etanólico	3,83	-0,172
<i>B. intermedia</i>	Aquoso a Frio	5,01	-0,191
	Aquoso a Quente	4,93	-0,102
	Etanólico	3,55	-0,104

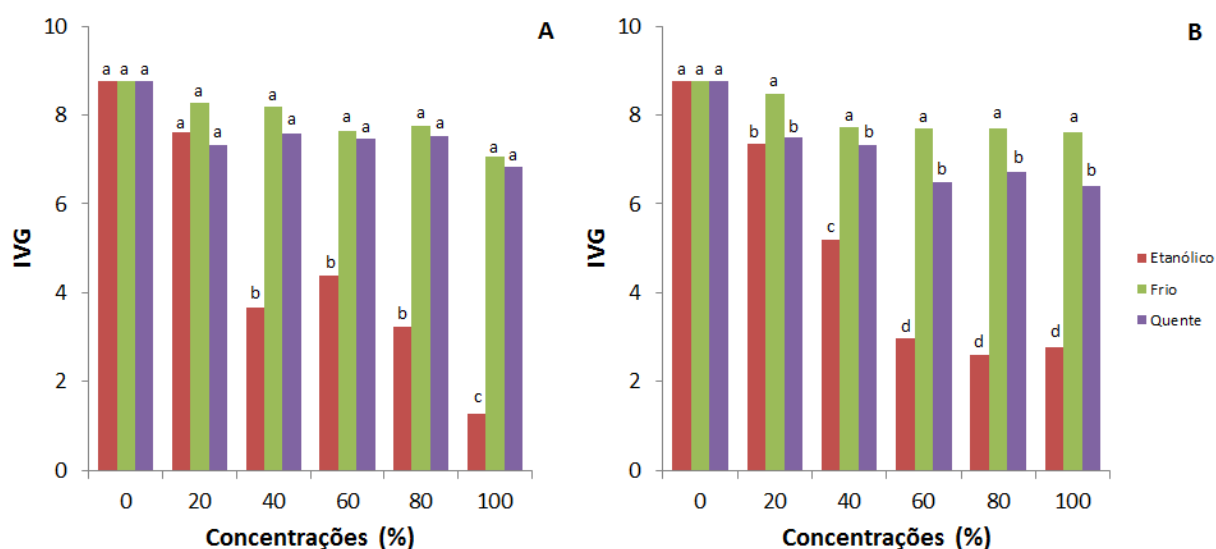
**Ensaio de fitotoxicidade** – Para porcentagem de germinação (%G) com 24h e 48h, os extratos aquosos frio e quente de *B. verbascifolia* não apresentaram diferença estatística entre si e entre as concentrações e o controle. Já o extrato etanólico ocasionou reduziu a %G, em ambas análises (24h e 48h), sobretudo nas maiores concentrações (Fig. 1A e 1C). Para *B. intermedia*, a %G com 24h não apresentou diferença estatística entre o controle e as concentrações do extrato aquoso frio. Resultados semelhantes foram observados para o extrato aquoso quente, diferindo apenas na concentração 100%. Para a extração etanólica verifica-se efeito inibitório na germinação com 24h a partir da concentração 60%(Fig. 1B). Para %G com 48h não houve diferença entre as concentrações dos extratos aquosos e o controle, porém houve redução da germinação de *Lactuca sativa* submetida ao extrato etanólico (Fig. 1D).



**Figura 1.** Porcentagem de germinação (%G) com 24h e 48h de *L. sativa* L. exposta aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. **A e C)** *B. verbascifolia*. **B e D)** *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

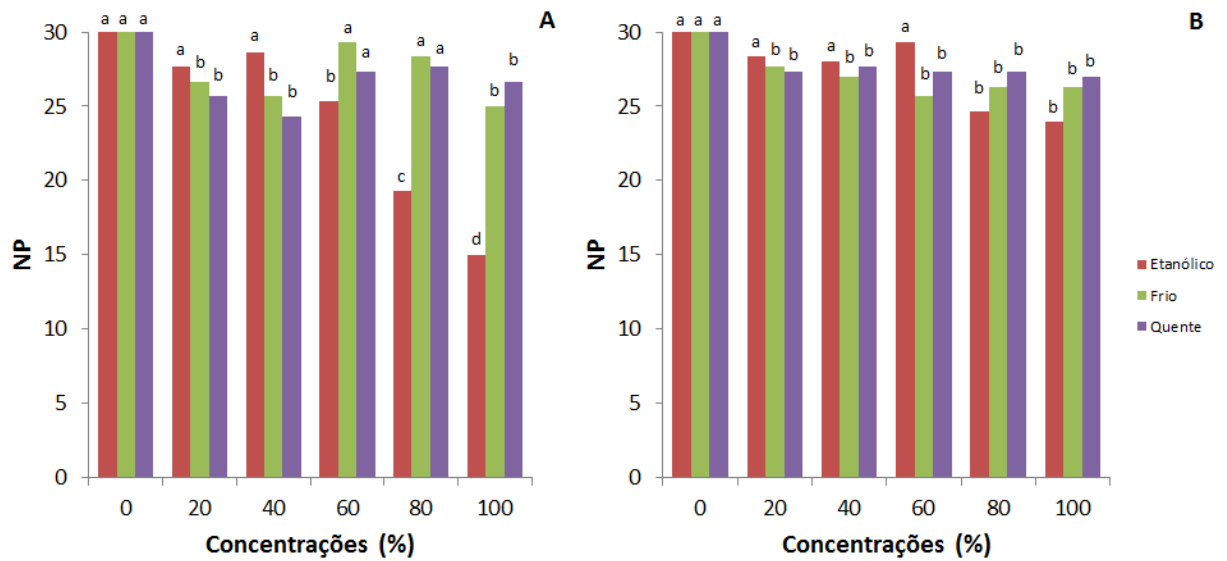
Com relação ao índice de velocidade de germinação (IVG) do bioteste exposto aos extratos de *B. verbascifolia*, os extratos aquosos frio e quente não apresentaram diferença estatística significativa entre as concentrações e o controle (Fig. 2A). A extração etanólica propiciou um atraso na germinação, sendo que as concentrações 40, 60 e 80% foram estatisticamente iguais entre si, e a concentração 100% ocasionou um IVG significativamente menor do que as demais (Fig. 2A). Para *B. intermedia* não houve diferença entre as concentrações do extrato

aquoso frio e o controle. Para o extrato aquoso quente foi observado atraso na germinação quando comparadas ao controle, porém não apresentaram diferença estatística entre si. Na extração etanólica, verifica-se um atraso na germinação em que as concentrações 60, 80 e 100% (estatisticamente iguais entre si) reduziram significativa no IVG (Fig. 2B).



**Figura 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de *L. sativa* L. exposta aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. **A)** *B. verbascifolia*. **B)** *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

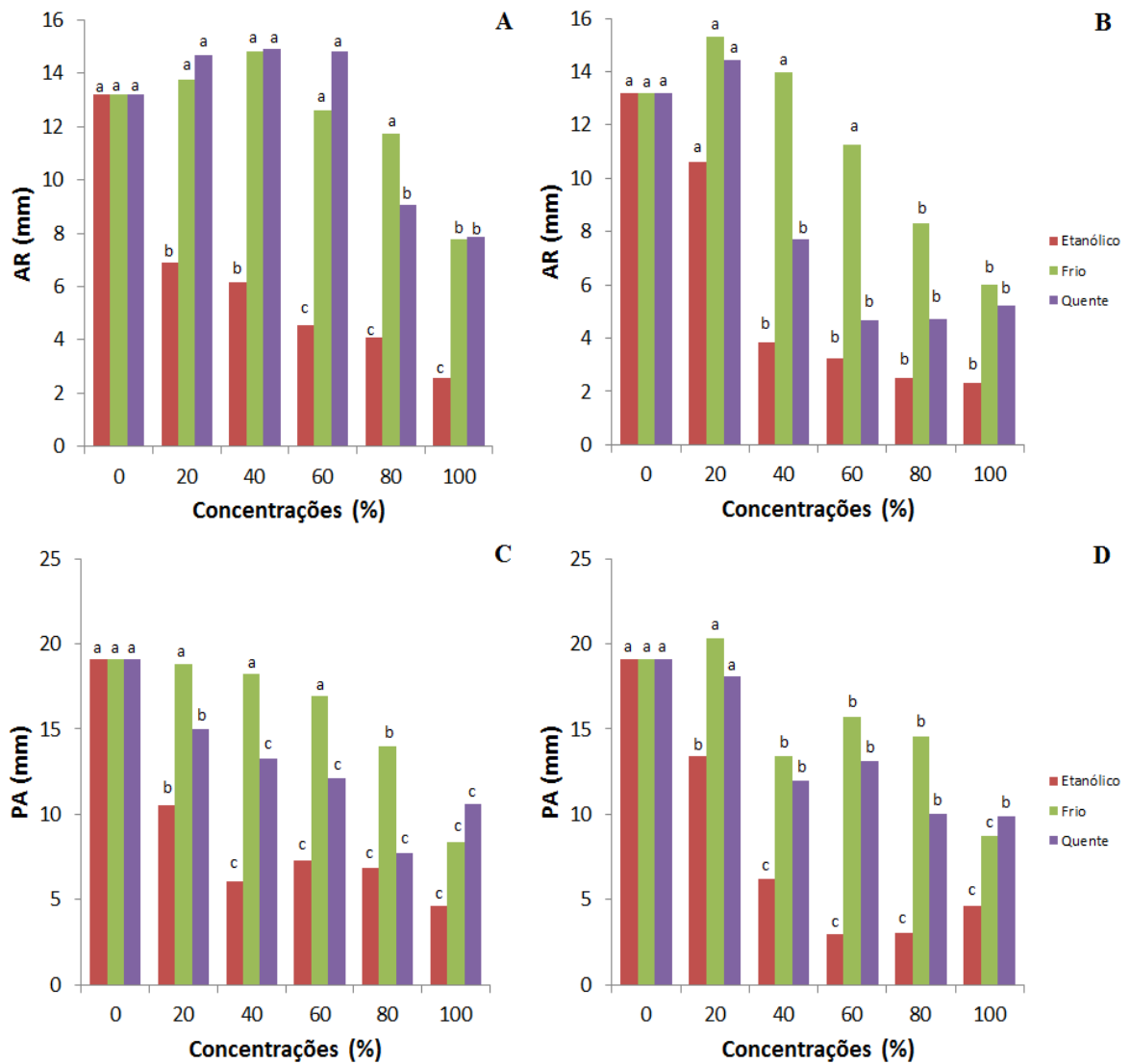
No parâmetro número de plântulas normais (NP) houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as duas espécies de *Byrsonima* sp., sendo *B. verbascifolia* mais fitotóxica em relação a *B. intermedia*. Os extratos aquosos frio e quente de *B. verbascifolia* apresentaram um comportamento semelhante entre si, evidenciando baixa influência no NP, mesmo nas maiores concentrações, enquanto o extrato etanólico nas concentrações 80 e 100% reduziu cerca 50% o NP em relação ao controle (Fig. 3A). Em *B. intermedia*, verifica-se baixa influência dos extratos no NP para as três formas de extração (Fig. 3B).



**Figura 3.** Número de plântulas normais (NP) de *L. sativa* L. exposta aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

No alongamento de raiz (AR) também houve diferença entre as duas espécies de *Byrsonima* sp., em que *B. intermedia* se mostrou mais fitotóxica. Para *B. verbascifolia*, verifica-se que o extrato aquoso quente reduziu o AR nas concentrações 80 e 100%, e o aquoso frio na concentração 100% (Fig. 4A). O extrato etanólico reduziu significativamente o crescimento das raízes do bioteste a partir da concentração 60%. Para *B. intermedia*, o extrato aquoso frio influenciou no AR a partir da concentração 80%, enquanto que o extrato quente e etanólico causaram inibição na concentração 40% (Fig. 4B).

Para o comprimento de parte aérea (PA) houve inibição desse parâmetro para as duas espécies, sendo que na extração aquosa fria, a inibição se mostrou mais evidente na concentração 100% e para as extrações aquosa quente e etanólico a partir da concentração 40% (Fig. 4C e 4D).



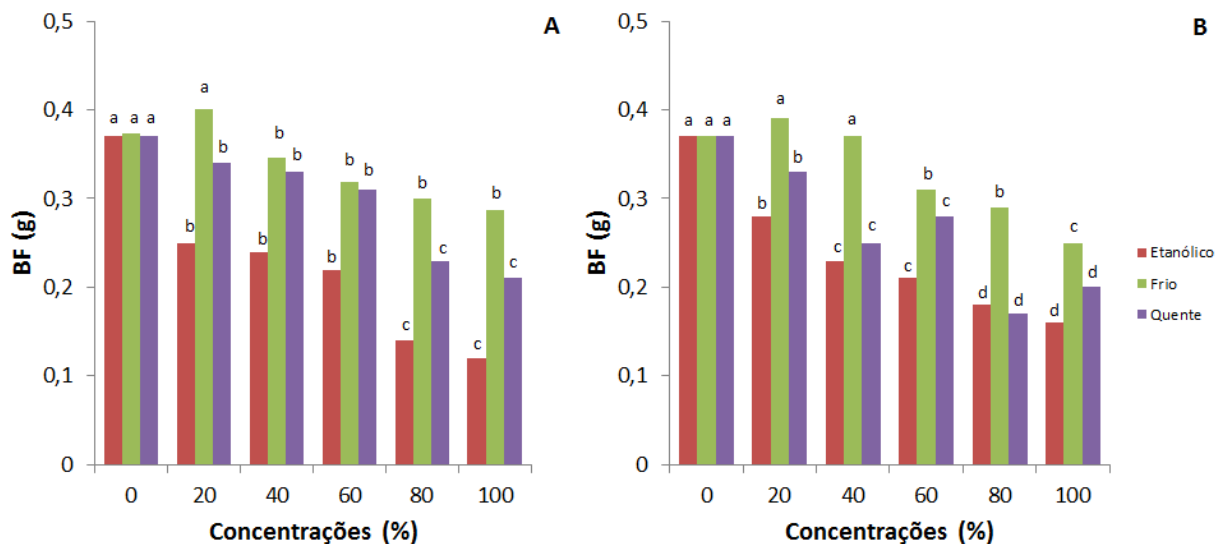
**Figura 4.** Alongamento de raiz e comprimento de parte aérea (mm) de *L. sativa* L. exposta aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. **A e C)** *B. verbascifolia*. **B e D)** *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Nos biotestes expostos aos extratos de ambas espécies observou-se que o órgão de *L. sativa* que mais sofreu efeito fitotóxico foi a raiz (Fig. 5) e este efeito foi intensificado com o aumento da concentração dos extratos utilizados.



**Figura 5** - Raiz normal de *Lactuca sativa* L. (A). Raízes expostas aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. com desenvolvimento anômalo (B), com escurecimento da zona meristemática (C).

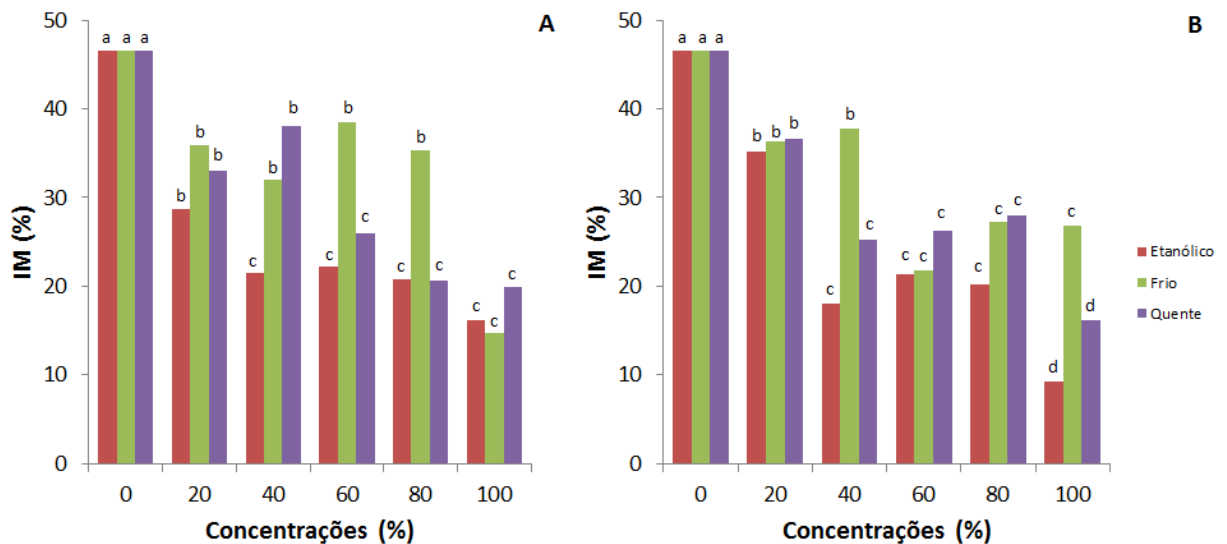
A biomassa fresca (BF) para ambas as espécies, nas três formas de extração, também foi influenciada pela exposição do bioteste aos tratamentos (Fig. 6). Semelhante ao comportamento nos demais parâmetros, esse efeito foi mais evidente nas concentrações 80 e 100% do extrato etanólico.



**Figura 6.** Biomassa fresca (g) de *L. sativa* L. exposta aos diferentes extratos de *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Para o parâmetro biomassa seca (BS) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as espécies, formas de extração e concentração.

**3.3 Ensaios de citotoxicidade** –Para as análises de citotoxicidade, tanto para *Byrsonima verbascifolia* quanto para *Byrsonima intermedia*, verificou-se redução no índice mitótico (IM) em relação ao controle para todas as formas de extração. Tal efeito é mais evidente nas maiores concentrações dos três extratos, sendo a concentração de 100% responsável por reduzir o índice de divisão celular a níveis muito baixos, exceto para o extrato frio de *B. intermedia* (Fig. 7).

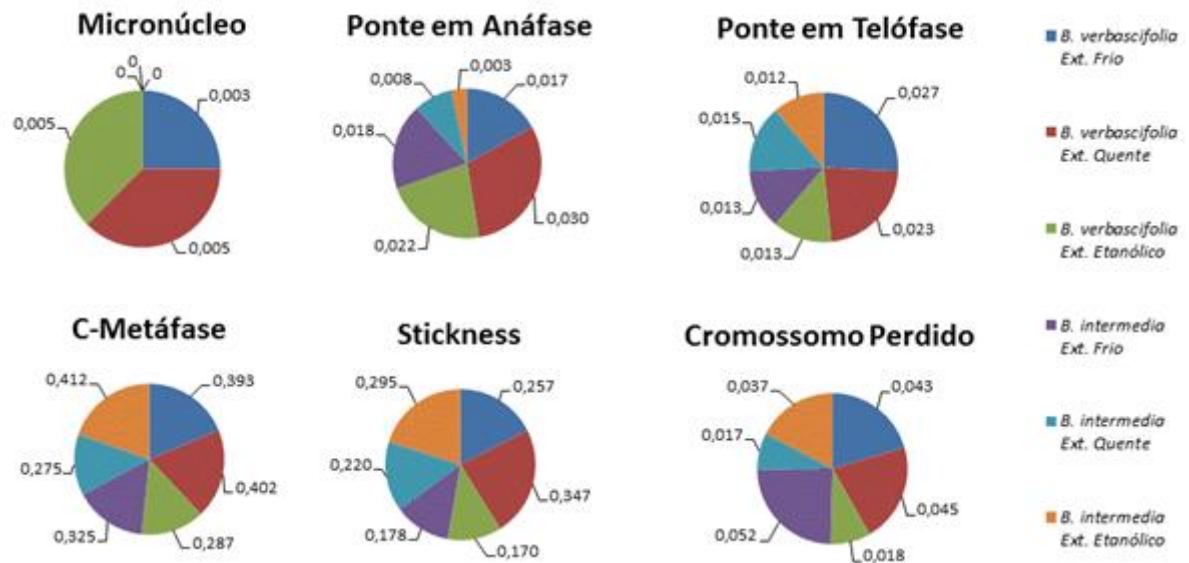


**Figura 7.** Índice mitótico (%) em células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* L. exposta às folhas de *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p>0,05$ ).

Dentre as seis anormalidades cromossômicas analisadas, a presença de micronúcleo foi verificada apenas nos tratamentos de *B. verbascifolia*, com baixa frequência. Ponte em anáfase, ponte em telófase e cromossomo perdido foram observadas para ambas espécies com proporções semelhantes. As anormalidades que apareceram em maior frequência nas células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos das duas espécies são C-metáfase e



*stickiness* (Fig. 8).



**Figura 8.** Frequência de anormalidades cromossômicas (%) em células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* L. exposta às folhas de *Byrsonima* spp. A) *B. verbascifolia*. B) *B. intermedia*. Letras iguais entre as concentrações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Os níveis de pH bem como os potenciais osmóticos dos extratos de *Byrsonima* spp. estão dentro dos limites ideais descritos na literatura para esse tipo de bioensaio. De acordo com Pinto & Kolb (2015), valores de pH semelhantes aos encontrados nesse trabalho não interferem nos processos de germinação e o crescimento inicial de *L. sativa*. Além disso, soluções com um potencial osmótico de até -0,2 MPa não têm nenhum efeito no crescimento de alface (Gatti *et al.* 2014).

Os resultados dos bioensaios confirmam que as espécies de Cerrado *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* apresentam atividade fitotóxica sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Os dados obtidos corroboram com os resultados encontrados em estudos de espécies de Cerrado, dentre elas as das famílias Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae, Lauraceae e Annonaceae (NOVAES *et al.* 2013; NOVAES *et al.* 2015). De acordo com os *screening* fitoquímicos relatados na literatura (BESSA *et al.* 2013; PINTO & KOLB 2015), os principais metabólitos secundários presentes em plantas de Cerrado que têm reconhecida ação alelopática são compostos fenólicos, terpenos, triterpenos, alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas e antraquinonas. Trabalhos realizados com folhas das espécies *B. verbascifolia* e *B. intermedia* identificaram como componentes principais os flavonóides, catequinas, taninos, saponinas e triterpenoides (MOREIRA *et al.* 2011; PINTO & KOLB 2015; CASTRO *et al.* 2016). Dentre esses metabólitos, as saponinas têm sido alvo de vários estudos de alelopatia que incluem o isolamento de substâncias específicas a partir de extratos orgânicos ricos em saponinas, já que estas apresentam reconhecida atividade sobre os parâmetros de germinação, crescimento inicial e citotoxicidade (DANELUZZI *et al.* 2014; JELASSI *et al.* 2016).

As formas de extração interferiram na germinação das sementes de *L. sativa*, sendo que os extratos aquosos frio e quente propiciaram dados de germinação superiores ao etanólico. Esse efeito pode estar relacionado diretamente com a composição fitoquímica dos extratos

etanólicos utilizados, uma vez que esta forma de extração pode selecionar conjuntos específicos de moléculas orgânicas, de maior ou menor afinidade com o solvente utilizado (NETO *et al.* 2014). De acordo com Gonçalves *et al.* (2013), a análise cromatográfica por *High-PerformanceLiquid Chromatography* (HPLC) de extrato metanólico de folhas de *B. verbascifolia* apresenta perfis espectrais compatíveis para galato, quercetina, catequina e/ou epicatequina, demonstrando a presença de taninos e flavonóides. Para *B. intermedia*, dados semelhantes foram encontrados por Rodrigues (2007), onde análises por HPLC demonstraram compostos derivados de ácidos fenólicos, catequinas e presença significativa de taninos condensados. Gatti *et al.* 2004 e Novaes *et al.* 2013 relatam que tais compostos apresentam atividade alelopática e a quantidade e composição destes metabólitos apresentam variações de acordo com a espécie estudada, o estágio de desenvolvimento e a época de coleta (GUSMAN *et al.* 2008). Castro (2003) relata que os teores de taninos totais bem como os níveis de fenóis totais de *B.verbascifolia* podem variar de acordo com a sazonalidade, fazendo-se necessários mais estudos que evidenciem além dos compostos secundários presentes nos extratos estudados, a influência da época de coleta do material vegetal nas respostas fito e citotóxicas.

Estudos com extrato etanólico de folhas de *Annona coriacea* (Annonaceae) sobre a germinação e crescimento inicial de alface exibiram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, sendo os parâmetros mais afetados a germinação e o alongamento de raízes (NOVAES *et al.* 2015). Os efeitos fitotóxicos mais evidentes em raízes e intensificados com o aumento da concentração dos extratos utilizados corroboram com os resultados obtidos por Cândido *et al.* (2010) e Novaes *et al.* (2015), principalmente para o extrato etanólico. Foi possível observar anormalidades no sistema radicular, onde as raízes primárias estavam atrofiadas, anômalas e, em alguns casos, ausentes. Esse tipo de anormalidade em plântulas de *L. sativa* também foi observado em outros estudos de

alelopatia (ÁQUILA, 2000; GATTI *et al.* 2004; GUSMAN *et al.* 2008). Sendo assim, a presença de anormalidades em raízes pode ser um bom parâmetro a ser observado em ensaios de fitotoxicidade, pois a raiz é o órgão que primeiro mantém contato com o extrato, além de ser mais sensível à ação alelopática quando comparada à parte aérea (PIRES & OLIVEIRA, 2001; GUSMAN *et al.* 2008; ANDRADE *et al.* 2009).

O número de plântulas normais (NP), significativamente menor nas concentrações 80% e 100% do extrato etanólico de *B. verbascifolia*, infere que a quantidade de substâncias presentes nesse extrato tenha sido responsável pela redução nesse parâmetro quando comparada com *B. intermedia*, fazendo-se necessária a quantificação desses metabólitos nos extratos estudados.

As diferenças nos valores de biomassa fresca encontradas entre o controle e as formas de extração provavelmente está relacionada com a quantidade de água absorvida nos tecidos vegetais, e sugere-se que as plântulas submetidas aos extratos desenvolvam mecanismos de defesa os quais dificultam a absorção. Ressalta-se ainda que os efeitos ocasionados sobre o comprimento das raízes não se estenderam a alterações significativas na biomassa seca das plântulas de alface, sendo estes resultados semelhantes aos encontrados por Borella *et al.* (2012). Segundo Gatti *et al.* (2004) essa resposta pode estar relacionada a um investimento diferenciado de matéria orgânica na raiz ou na parte aérea, influenciado diretamente pelos compostos testados.

O índice mitótico (IM) mostrou ser um parâmetro indicativo da citotoxicidade dos diferentes extratos. Valores de IM menores que o controle negativo podem indicar citotoxicidade e que o crescimento e desenvolvimento de alface foram afetados pelos tratamentos (CARITÁ & MARIN-MORALES 2008; PAULA *et al.* 2015). Resultados semelhantes foram relatados por Freitas *et al.* (2015), em que as diferentes concentrações de extrato etanólico de *Helenium cf. amarum* reduziram o número de células em divisão do bioteste. No presente trabalho,

embora tenha ocorrido redução da proliferação celular, análises do AR em *L. sativa* expostas aos extratos aquosos mostram que as raízes apresentaram crescimento similar ao controle. De acordo com Moraes *et al.* (2015) esse crescimento pode estar atrelado à ação das expansinas, enzimas envolvidas no processo de expansão celular, e não ocasionado pelo aumento do número de células na zona meristemática da raiz.

Para o extrato etanólico IM e AR apresentaram comportamento similares permitindo inferir que a redução do comprimento radicular deve-se tanto à toxicidade desse extrato sobre o ciclo celular quanto ao metabolismo de alface. Efeitos sobre a morfofisiologia de plantas-alvo são citados na literatura como manifestações secundárias de alterações que ocorrem em nível celular e molecular como cariocineses anômalas e distúrbios cromossômicos (FERREIRA & ÁQUILIA, 2000; LEME & MARIN-MORALES, 2009; ANDRADE-VIEIRA *et al.* 2014). Além disso, alguns trabalhos (LI *et al.* 2010, RIBEIRO *et al.* 2012) apontam que compostos fenólicos podem inibir o desenvolvimento das raízes e a divisão celular, causando atraso no crescimento.

A presença das anormalidades cromossômicas (AC) demonstra o potencial citotóxico das espécies avaliadas, podendo interferir no ciclo celular (LEME *et al.* 2008, ARAÚJO *et al.* 2015). De acordo com Leme & Marin-Morales (2009), AC indicadoras de efeitos clastogênicos são aquelas que apresentam pontes e quebras das cromátides; enquanto as que resultam de efeitos aneugênicos são perda e atraso de cromossomos, *stickiness*, núcleo multipolar e C-metáfase. Como demonstrado, as anormalidades que apresentaram maior frequência foram C-metáfase e *stickiness*, representando, portanto, um efeito aneugênico dos extratos sobre o bioteste. C-metáfase é evidenciada pelas alterações no fuso mitótico e na estrutura dos cromossomos interrompendo o ciclo celular na metáfase (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014). Embora C-metáfase tenha sido uma das AC mais frequentes, a literatura aponta que seus efeitos podem ser reversíveis; porém há possibilidade de induzir a formação de

células poliploides e alterando morfofisiologia de tecidos e órgãos (ODEIGA *et al.* 1997). A ocorrência de *stickiness* sugere que os extratos de *Byrsonima* interferem na organização da cromatina, da mesma forma como observado por Ribeiro *et al.* (2013) estudando *L. sativa* exposta a extratos etanólicos de *Annona crassiflora*. Segundo esses autores e também Pinheiro *et al.* (2015), essa AC se deve aos efeitos tóxicos de substâncias contidas nos extratos que desequilibram a proporção de proteínas estruturais, tais como as histonas, podendo levar a aglomeração e condensação dos cromossomos.

## 7. Conclusão

Extratos de folhas de *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima intermedia* mostram efeito tanto fitotóxico quanto citotóxico.

O extrato etanólico apresentou maior toxicidade independente da espécie.

Para a maioria dos parâmetros analisados não houve diferença estatística entre as espécies, porém para número de plântulas normais *B. verbascifolia* foi mais tóxica e para alongamento de raiz *B. intermedia* apresentou maior toxicidade.

C-metáfase e *stickiness* foram as anormalidades mais frequentes em células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos das duas espécies, indicando que estes apresentam efeito aneugênico.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## 7. Referências

- Andrade HM, Bittencourt AHC, Vestena S. 2009. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. Ciências e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1984-1990.
- Áquila MEA. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Iheringia – Série Botânica, Porto Alegre, v. 53, p. 51-66.
- Araújo SS, Fernandes TCC, Cardona YT, de Almeida PM, Marin-Morales M. A, dos Santos A. V, Brasileiro-Vidal AC. (2015). Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells. Journal of ethnopharmacology, v. 170, p. 16-19.
- Bessa, NGF, Borges, JCM, Beserra, FP, Carvalho, RHA, Pereira, MAB., Fagundes, R, Campos, SL, Ribeiro, LU, Quirino, MS, Chagas Junior, AF, Alves, A. 2013. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, n. 4, p. 692-707.
- Brasil. 2010. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: ANVISA.
- Cândido ACS, Dias ACR, Serra AP, Christoffoleti PJ, Scalon SPQ, Pereira MTL. 2010. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 268-272.
- Caritá R, Marin-Morales MA. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere, v. 72, p. 722-725.
- Castro AHF. 2003. Aspectos da propagação, ecofisiologia e fitoquímica de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do Cerrado. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Castro AHF, Paiva R, Alvarenga AA, Vitor SMM. 2009. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnoendron adstringens* (Mart.) Coville]. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390.
- Castro AHF, Braga KDQ, Sousa FMD, Coimbra MC, Chagas RCR. 2016. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). Revista Ciência Agronômica, v. 47, n. 1, p. 143-151.
- Cecílio AB, de Faria DB, de Carvalho Oliveira P, Caldas S, de Oliveira DA, Sobral MEG, de Almeida VL. 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. Journal of Ethnopharmacology, v. 141, p. 975-981.
- Chiapusio G, Sanchez AM, Reigosa MJ, Gonzalez L, Pellissier F. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process?. Journal of Chemical Ecology, v. 23, n. 11, p. 2445-2453.



- Daneluzzi GS, Marinho dos Santos VH, Silva LP, Goncalves da Silva RM. 2014. Avaliação dos potenciais fitotóxico e citotóxico de *pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) miers (bignoniaceae). *Bioscience Journal*, p. 1231-1240.
- Davis CC, Anderson WR. 2010. A filogenia genérico completa de Malpighiaceae inferida a partir de dados de sequências de nucleótidos e morfologia. *American Journal of Botany*, v.97, n.12, p.2031-2048.
- Ferreira AG, Aquila MEA. 2000. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 175-204.
- Ferreira DF. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciências Agroteciências, Lavras*. v.38, n.2, p.109-112.
- Ferreira MC, Souza JRP, Faria TJ. 2007. Potencial alelopático de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. *Ciência e Agrotecnologia* v.31, p.1054-1060.
- Figueiredo ME, Michelin DC, Sannomiya M, Silva MA, Dos Santos LC, Almeida LFR, Brito ARMS, Salgado HRN, Vilegas W. 2005. Avaliação química e da atividade antidiarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 41 n. 1, p. 79-83.
- Freitas JV, Batitucci MDCP, Andrade MA, da Luz AC, Pereira UJ. 2015. 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.
- Gatti AB, Perez SCJGA, Lima MIS. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactucasativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 459- 472.
- Gatti AB, Takao LK, Pereira VC, Ferreira AG, Lima MIS, Gualtieri SCJ. 2014. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. *Brazilian Journal of Biology*. v. 74, p. 64-69.
- Giotto AC, Oliveira SCC, Joelma GPS. 2007. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre*, v. 5, supl. 2, p. 600-602.
- Gonçalves CA, Siqueira JM, Carollo CA, Mauro MO, Davi N, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Castro AH, Fernandes L, Chagas RR, Auharek SA, Oliveira RJ. 2013. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swissmice. *Journal of Ethnopharmacology* v. 150, p. 843- 850.
- Guilhon-Simplicio F, Pereira MM. 2011. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, v.34, n.6, p.1032- 1041.
- Gusman GS, Bittencourt AHC, Vestena S. 2008. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. *Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá*, v. 30, n. 2, p. 119-125.

- Jelassi A, El Ayeb-Zakhama A, Nejma AB, Chaari A, Harzallah-Skhiri F, Jannet HB. 2016. Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian Acacia species. *Industrial Crops and Products*.
- Kuras M, Nowakowska J, Sliwinska E, Pilarski R, Ilasz R, Tykarska T, Zobel A, Gulewicz K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol*, v.107, p. 211–221.
- Leme DM, Marrin-Morales MA. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its applications. *Mutation Research* v. 682, p. 71-78.
- Leme DM, Angelis DF, Marin-Morales MA. 2008. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, v. 88, p. 214-219.
- Mamede MCH. 2013. *Byrsonima*. In: REFLORA: lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008827>>. Acesso em: 20 Set. 2014.
- Moraes RM, dos Santos Filho PR, Carvalho M, de Lima Nogueira M, Barbosa S. 2015. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociencias*.v.13, n. 2.
- Moreira LQ, Vilela FC, Orlandi L, Dias DF, Santos AL, Da Silva MA, Paiva R, Alves-Da-Silva G, Giusti-Paiva A. 2011. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss.in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 138, n. 2, p.610-5.
- Mousavi SH, Hassandokht MR, CHOUKAN, R., SEPAHVAND, N., KHOSROWCHALI, M. 2013. Cytological study of chromosome and genome composition of Iranian Lettuce (*Lactuca sativa* L.) accessions. *European Journal of Experimental Biology*. n. 3, v. 1, p. 303-311.
- Neto MVL, Malheiros RSP, Santana FS, Machado LL, Mapeli AM. 2014. Avaliação alelopática de extratos etanólicos de *Copaifera sabulicola* sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, *Lycopersicum esculentum* e *Zea mays*. *Biotemas*. v. 27, n. 3, p. 23-32.
- Nogueira RC, Paiva R, Lima EC, Soares GA, Oliveira LM, Santos BR, Emrich EB, Castro AHF. 2008. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima indermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48.
- Novaes P, Molinillo JMG, Varela RM, Macías FA. 2013. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savana) plants. *Phytochemistry Reviews*. v.12, n. 4, p. 839–855.
- Novaes P, Torres PB, dos Santos DYAC. 2015. Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. *Brazilian Journal of Botany*. p. 1-7.
- Odeigah PGC, Nurudeen O, Amund OO. 1997. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas*. v. 126, p. 161-167.

- Oliveira J, Peixoto C, Poelking V, Almeida A. (2015). Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizanthae*, *Sorghum bicolor* com potencial alelopático para uso como herbicida natural. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 17, n. 3, p. 379-384.
- Paula C, Canteli V, Silva C, Miguel O, MIGUEL M. (2015). Study of phytotoxic potential of extracts of *Bauhinia unguolata* L. on cell division and enzyme activity in lettuce seedlings. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, p. 577-584.
- Pinheiro PF, Costa AV, Alves TDA, Galter IN, Pinheiro CA, Pereira AF, Fontes MMP. (2015). Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 41, p. 8981-8990, 2015.
- Pinto GFS, Kolb RM. 2015. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savanna. *Botany*. v. 94, n. 999, p. 1-9.
- Pires NM, Oliveira VR. 2001. Alelopatia. In: OLIVEIRA, R.S.; CONSTANTIN, J. (Ed.). *Plantas daninhas e seu manejo*. Agropecuária. p.145- 185.
- Reigosa M, Gomes AS, Ferreira AG, Borghetti F. 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 629-646.
- Ribeiro LO, Barbosa S, Balieiro FP, Beijo LA, Santos BR, Gouvea CMCP, Paiva LV. 2012. 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.
- Ribeiro LR, Santos MF, Silva QM, Palmieri MJ, Andrade-Vieira L, Davide LC. (2013). Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). *Biologia*, v. 68, n. 3, p. 433-438.
- Rodrigues CM. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 197p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.
- Rodrigues LCA, Barbosa S, Pazin M, Maselli BS, Beijo LA, Kummrow F. 2013. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade de água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, v.17, n.10, p.1099–1108.
- Saldanha AA, Soares AC. 2015. Compostos químicos e aspectos botânicos, etnobotânicos e farmacológicos da *Byrsonima verbascifolia* Rich ex. A. Juss. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Campinas. v.17, n.4, supl. II, p. 1000-1006.
- Santos MAF, da Silva MAP, dos Santos ACB, Alencar SR, Torquato IHS, Andrade AO, de Oliveira AH. 2015. Allelopathy of *Miconia* spp. (Melastomataceae) in *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Journal of Agricultural Science*. v. 7, n.12, p. 151.
- Sasidharen S, Chen Y, Saravana D, Sundram KM, Yoga Latha L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. v. 8, n. 1, p.1-10.

Silva FM, Áquila, MEA. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*. v. 20, n. 1, p. 61-69.

Simões CMO, Schemkel EP, Gosmann G. Mello JCP, Petrovick PR. 2007. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis. Porto Alegre: UFRGS/UFSC.

Simões MS, Mandail RH, Barbosa S, Nogueira ML. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. *Biotemas*. v.26, n.3, p. 29-36.

Sinkkonen J. 2006. Ecological relationships and allelopathy. In Reigosa MJ, Pedrol N, & González L. 2006. *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Springer Science & Business Media.

Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Santos LS. 2010. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório-Revisão crítica. *Planta Daninha, Viçosa*, v. 28, n. 3, p. 689-697.

Takao LK, Ribeiro JPN, Lima MIS. 2011. Potencial alelopático de macrófitas aquáticas de um estuário cego. *Acta Botânica Brasilica*. v. 25, p. 324-330.

Zeng RS, Mallik AU, Luo S. 2010. *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York: Springer Verlag. p. 426.