

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL/MG

MARINA DE LIMA NOGUEIRA

FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DE
***Schinus molle* L. (Anacardiaceae) EM *Lactuca sativa* L.**

ALFENAS/MG
2014

MARINA DE LIMA NOGUEIRA

**FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DE
Schinus molle L. (Anacardiaceae) EM *Lactuca sativa* L.**

Trabalho de Dissertação apresentado como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Colaboradores: Prof. Dr. Luís Alberto Beijo (ICEx-UNIFAL-MG), Dra. Nádia Alves Campos (Bolsista PRODOC-CAPES) e Simone Cristina dos Santos (Bolsista PROBIC-CNPq – Ciências Biológicas)

**ALFENAS/ MG
2014**

Nogueira, Marina de Lima.

Fitotoxicidade e citotoxicidade de extratos de *Schinus molle* L.
(Anacardiaceae) EM *Lactuca sativa* L./ Marina de Lima Nogueira. –
Alfenas, MG, 2014.

65 f. -

Orientador: Sandro Barbosa

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

Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Aroeira - Salsa. 3. Bioensaio. 4. Plantas – População. 5.
Extratos vegetais. I. Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD 581.5



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

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



MARINA DE LIMA NOGUEIRA

“FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DE *Schinus molle* L.
(ANACARDIACEA) EM *Lactuca sativa* L.”

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

Aprovado em: 30 de julho de 2014.

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Marcelo Polo
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof.^a Dr.^a Larissa Fonseca Andrade Vieira
Instituição: UFLA

Assinatura:  _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS, por ter guiado meus passos até esse momento e colocado pessoas que me ajudaram a crescer.

Aos meus pais, Doralice Alves de Lima e Luiz Antônio Nogueira, e a minha irmã, Iara de Lima Nogueira, por me apoiarem e estar sempre ao meu lado durante essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Sandro Barbosa, por todas as oportunidades, por esses anos de aprendizado, convívio e pelos conselhos durante essa fase importante da minha vida.

Aos meus amigos que fizeram parte e me ajudaram a chegar aqui, pois sem amigos não se chega a lugar algum.

Aos amigos de mestrado pelos momentos que passamos, muitas vezes corridos, mas que valeram cada minuto.

Ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN) e a família BIOGEN que compartilharam dias e conhecimentos importantes de suas vidas durante essa etapa.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Tecnologia Ambiental, assim como a Universidade Federal de Alfenas pela grande oportunidade.

À Condição de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Por fim, a todos que me viram chorar e sorrir, que me aguentaram nos momentos felizes e principalmente nos momentos tristes fazendo parte desta conquista, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Schinus molle L. é uma planta pertencente à família Anacardiaceae utilizada para fins medicinais, paisagístico e na silvicultura. Seus metabólitos, no contexto ambiental, podem interagir com outras plantas e organismos presentes no ecossistema por meio do efeito conhecido como alelopatia. Essa interação pode ser avaliada por vários parâmetros, fisiológicos, bioquímicos e citogenéticos em bioensaios vegetais. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito alelopático de diferentes órgãos de *S. molle* L., bem como o efeito de diferentes modos de manejo (presença e ausência de poda) sobre a ação alelopática da espécie em bioensaios com Alface (*Lactuca sativa* L.). O primeiro trabalho consistiu em avaliar o comportamento do bioteste exposto aos extratos aquosos e etanólicos de diferentes órgãos vegetais que foram coletados de uma população na cidade de Alfenas- MG. A segunda parte do trabalho teve por objetivo avaliar diferentes modos de manejo sobre a ação alelopática da espécie, para isso foram coletadas folhas em duas populações distintas, uma com poda regular e outra sem poda. Para avaliar o efeito alelopático da espécie foram avaliados germinação (G), número de plântulas normais (NP), índice de velocidade de germinação (IVG), alongamento de raiz (AR), massa fresca (BF), massa seca (BS), índice mitótico (IM) e anormalidades cromossômicas (AC). O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados, com três repetições e cinco concentrações no primeiro experimento. No segundo experimento foram avaliadas somente quatro concentrações. A análise estatística consistiu de análise de variância - ANAVA ($p < 0,05$), ajustado modelo de regressão linear, quando possível; para os demais resultados foi feita comparação de médias pelo teste de Scott-Knott. Nos resultados obtidos no primeiro experimento tanto para extrato aquoso quanto para extrato etanólico foram observadas diferenças entre os órgãos vegetais testados, sendo as menores interferências obtidas quando a Alface foi exposta a extratos de fruto maduro e as maiores interferências quando expostos a extratos de frutos verdes. Em todos os casos foi observado que o aumento da concentração reduz o valor do parâmetro avaliado, sendo evidente o efeito concentração dependente. No segundo experimento também foi observado efeito concentração dependente nos parâmetros testados com exceção da biomassa fresca exposta ao extrato etanólico, independente da população. Extrato aquoso e etanólico apresentaram comportamento diferente nos diferentes parâmetros testados, com exceção de IM, BF e AC, que a resposta do bioteste não dependeu do tipo de extrato. Todas as variáveis evidenciaram o efeito alelopático da espécie.

Palavras-chave: Alelopatia. Aroeira-salsa. Fitotoxicidade. Citogenotoxicidade.

ABSTRACT

Schinus molle L. is a plant belonging to the family Anacardiaceae that presents many popular uses, among which the medical, landscape and timber purposes. Their metabolites, at an environmental context, can interact with plants and other organisms in the ecosystem through the effect known as allelopathy. This interaction can be assessed by several parameters, mainly the germination of neighboring plants. In this context, the aim of this study was to evaluate the allelopathic effect of different organs of *S. molle* L., as well as the behavior of this effect in populations under different environmental and management pressures, in bioassays with lettuce (*Lactuca sativa* L.). The first work consisted in to evaluate the behavior of lseeds of letucce exposed to water and ethanol extracts of different plant structures that were collected from a population of Alfenas. The second part of the work was to evaluate the interference effect of pruning on allelopathy. For it, leaves were collected in two distinct populations, one with pruning and one without regular pruning. To evaluate the allelopathic effect of *S. molle*, germination, number of normal seedlings, germination velocity index, root elongation, fresh weight, dry weight, mitotic index and chromosomal abnormalities were evaluated. The experimental design was a completely randomized block design with three replications and five concentrations in the first experiment. In the second experiment were evaluated only four concentrations. Statistical analysis consisted of analysis of variance - ANOVA ($p < 0.05$), when possible was adjusted linear regression model, and for the other results means were compared by Scott-Knott test. The results obtained in the first experiment for both, aqueous and ethanol extract, showed differences between plant organs tested, with lower interference obtained when lettuce was exposed to extracts of ripe fruit and the greatest interference when exposed to extracts of green fruits. In all cases it was observed that with increasing concentration there is a decrease of the measured parameter, showed concentration dependent effect. In the second experiment concentration-dependent effect was also observed in the parameters tested except for fresh biomass exposed to ethanol extract, regardless of population. All variables showed the allelopathic effect of species.

Keywords: Allelopathy. *Aroeira-salsa*. Phytotoxicity. Cytotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Características botânicas de <i>Schinus molle</i> L.	11
2.2 Metabitos secundários e os fatores que influenciam sua produção	12
2.3 Bioensaios e biotestes aplicados a estudos de alelopatia.....	16
3 JUSTIFICATIVA	18
4 OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo Geral	19
4.2 Objetivos Específicos	19
REFERÊNCIAS	20
SEGUNDA PARTE	26
ARTIGO I: Phytotoxicity of extracts of different structures of <i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae)	26
INTRODUCTION	30
METHODOLOGY	31
Sample collection.....	31
Phytotoxic test	32
Cytotoxicity test.....	32
Data analysis	33
RESULTS	33
DISCUSSION.....	41
CONCLUSIONS	43
REFERENCES	44
ARTIGO II: Efeito alelopático de extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Schinus molle</i> L. sob diferentes regimes de poda	49
INTRODUÇÃO	51
METODOLOGIA.....	52
Obtenção do material botânico e extratos.....	52
Testes fitotóxicos	53
Testes citogenotóxicos.....	54
Análises estatísticas	54
RESULTADOS	55
DISCUSSÕES	61
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Plantas da família Anacardiaceae são encontradas, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. *Schinus molle* L. é uma das espécies mais conhecidas da família, sendo a ela atribuídas as seguintes denominações populares: Anacauíta, Aroeira-salsa, Aroeira-mansa, Aroeirinha e Aroeira-de-folha-de-salsa (FENNER et al., 2006). Trata-se de uma planta heliófita com características xerofíticas, originária do Peru, encontra-se em condição ruderal no Brasil, Uruguai, Argentina e outros países da região Andina. No Brasil, sua ocorrência mais comum se estende aos estados das regiões Sul e Sudeste (SANTOS et al., 2004).

Além do apeto visual, que promove seu amplo uso como planta ornamental na arborização urbana e confecção de jardins, a Aroeira-salsa possui folhas e frutos que contêm óleos essenciais picantes que são bastante utilizados na medicina por apresentarem propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatórias, antiespasmódicas, antipiréticas e cicatrizantes (SANTOS et al., 2007). Dentre as substâncias do metabolismo secundário identificadas em *S. molle* encontram-se flavonóides, taninos e terpenos. (SANTOS et al., 2007). Essas substâncias, além de apresentarem importância no metabolismo do vegetal e serem fonte de interesse para estudos farmacêuticos, podem conferir às plantas a capacidade de interagirem com outras plantas e organismos, impactando o ambiente adjacente (FERREIRA; AQUILA, 2000). Dentro desse contexto, essas substâncias são denominadas aleloquímicos e apresentam grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais por meio da alelopatia (FERREIRA; AQUILA, 2000).

A alelopatia caracteriza-se como um fenômeno químico-ecológico no qual metabólitos secundários produzidos por uma espécie vegetal são liberados no ambiente e interferem na germinação e/ou no desenvolvimento de outros seres vivos do mesmo habitat (VARANDA, 2006). Esta denominação pode ser dada a qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre outra (FERREIRA, 2004). Os metabólitos secundários, embora na maioria das vezes não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, podem garantir vantagens adaptativas para a sobrevivência e perpetuação da espécie (SANTOS, 2001). De acordo com Pawlowski e Soares (2007) a Aroeira-salsa possui características ecológicas que indicam grande capacidade de competição em seu habitat, influenciando a dominância e a sucessão das plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas.

O uso de *Lactuca sativa* como bioteste nos estudos alelopáticos é indicado devido a sensibilidade da espécie, mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos. Além disso, a sua utilização é favorecida, pois apresenta peculiaridades observadas, pela sua germinação rápida, de aproximadamente 24h; crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação; insensibilidade aos potenciais osmóticos (RICE, 1984).

Apesar da capacidade de competição da espécie, poucos trabalhos na literatura versam sobre as principais classes de compostos presentes no metabolismo secundário da Aroeira-salsa, bem como sobre a compreensão do efeito biológico de extratos da espécie em modelos vegetais. Nesse sentido, determinar a ação biológica de *S. molle*, bem como as interações dessas plantas com a biota associada torna-se necessário. Com isso, o presente trabalho teve por objetivo verificar os efeitos alelopáticos de extratos de diferentes órgãos e populações de *S. molle* em bioensaios com Alface (*Lactuca sativa*).

2 DESENVOLVIMENTO

Nesse tópico vamos abordar: características botânicas de *Schinus molle* (Figura 1), metabólitos secundários e fatores que influenciam a produção desses compostos. Assim como bioensaios e biotestes aplicados em estudos de alelopatia.

Figura1- Foto da espécie em estudo (*Schinus molle*) localizada na cidade de Alfenas-MG.



Fonte: Do autor

2.1 Características botânicas de *Schinus molle* L.

A família Anacardiaceae é típica de regiões subtropicais e tropicais, e apresentam espécies encontradas na América do Sul, África e Malásia. Representantes dessa espécie podem ser encontrados na forma de árvores de porte médio, arbustos, trepadeiras lenhosas e ervas perenes. Algumas espécies possuem canais resiníferos nas cascas e nas folhas. Existem espécies com flores pequenas, actinomorfas, bissexuais ou unissexuais com perianto duplo, diclamídea, com cálice pentâmero dialissépalo ou gamossépalo, a corola também é pentâmera dialipétala ou gamopétala. As suas folhas são alternadas, compostas de margem inteira ou, em algumas espécies, serradas e com inflorescência geralmente cimosas (LORENZI; SOUZA, 2005).

Os frutos produzidos por espécies dessa família possuem alta diversidade morfológica, podendo ser secos, deiscentes ou indeiscentes, com hipocarpo carnoso e alguns apresentam grande importância econômica, como o caju, a manga e a pimenta rosa (PELL, 2004). Além disso, os frutos e as sementes comestíveis quando fermentados, produzem uma bebida alcoólica conhecida como “Chica de molle” e quando estão secos produzem uma substância semelhante ao vinagre. Também são valiosos por seus compostos medicinais, pela sua madeira e pela utilização da espécie na paisagem urbana (PELL, 2004).

Dentre os mais variados gêneros e espécies, *Schinus molle* é uma das mais conhecidas, com grande dispersão na América Latina (SANTOS et al., 2007). No Brasil é encontrada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais, onde é conhecida como Aroeira-salsa (SASSET et al., 2008).

Esta espécie apresenta uma copa frondosa com tronco forte e que cresce muito rapidamente. Costuma se desenvolver em áreas íngremes com encostas secas, ravinas, vales e áreas compostas de solos rochosos e rasos. É considerada uma espécie ruderal de fecundação cruzada, selecionada por diferentes fatores ambientais, demonstrando uma grande variabilidade fenotípica. Por esse motivo é altamente recomendada para a recuperação de áreas degradadas e reflorestamento (BOTELHO, 2006).

S. molle é também utilizada para fins medicinais, pois apresenta alto potencial terapêutico, podendo, em doses adequadas, atuar como importantes medicamentos. Alguns produtos do metabolismo secundário da Aroeira-salsa estão presentes em folhas, cascas e raízes e são usados para aliviar ou curar reumatismos, infecções nos brônquios, úlceras, tumores, ansiedade e inflamações da pele; o látex da casca é usado como um emplastro para músculos e dores nos tendões. As folhas dessa espécie são utilizadas para extração de óleos com composição química variada que são utilizados popularmente como repelentes e bioinseticidas (SCOPEL et al., 2013). Além disso, a espécie é muito utilizada no paisagismo e na produção de madeira (SASSET et al., 2008).

2.2 Metabólitos secundários e os fatores que influenciam sua produção

A Aroeira-salsa possui características que indicam grande capacidade de competição com outras espécies, e apresenta metabólitos secundários de grande potencial biodinâmico. Assim, sua atividade alelopática é reconhecida como importante mecanismo ecológico que

influencia a dominância e sucessão das plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas (PAWLOWSKI; SOARES, 2007).

Na natureza as plantas são expostas a fatores bióticos e abióticos com os quais têm evoluído. A pressão seletiva por estes fatores ao longo do tempo resultou na competição entre as plantas por luz, água e nutrientes, revelando concorrência constante entre as espécies que vivem em comunidade. Como estratégia para vencer esta competição, algumas plantas desenvolveram mecanismos de defesa através de numerosas vias biossintéticas, nas quais as plantas sintetizam e acumulam uma variedade de metabólitos secundários que desempenham importante papel nas interações entre os organismos vivos (INDERJIT et al., 2011).

Estas substâncias são sintetizadas pelas plantas em pequenas quantidades e podem exercer diversas funções nos vegetais como a proteção contra herbivoria, predadores e patógenos, fornecimento de pigmentação às plantas, atração para polinizadores e proteger contra fatores ambientais como umidade, radiação ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais (BARBOSA, 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Os metabólitos secundários, portanto, são importantes na propagação e adaptação das espécies vegetais. Estes compostos interessam ao homem por sua potencialidade em se tornarem produtos terapêuticos, através da atividade neurotóxica, geralmente útil contra a herbivoria, podem atuar como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BARBOSA, 2008). Quando utilizados em doses adequadas também podem apresentar ações antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antiparasitárias, antivirais, dentre muitas outras (OLIVEIRA, et al. 2011).

Quando liberados no ambiente, esses metabólitos podem interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outras plantas causando benefícios ou prejuízos à elas. Quando atuam dessa forma, essas substâncias são denominadas aleloquímicos e essa interação é conhecida como alelopatia (RIZVI; RIZVI, 1992; FERREIRA; AQUILA, 2000; SOARES, 2000; FERREIRA, 2004; SANTOS, 2007; NASCIMENTO et al., 2012;).

Os metabólitos secundários, sejam eles aleloquímicos ou não, podem ser encontrados em todos os órgãos dos vegetais: caule, folhas, raízes, inflorescências e flores, frutos e sementes. Estes compostos são liberados no ambiente através da lixiviação dos tecidos, pela dissolução em água da parte aérea e das raízes ou pela volatilização dos compostos aromáticos das folhas, flores, caules e raízes (NASCIMENTO et al., 2012). A influência do aleloquímico nos organismos que vivem nos arredores da planta que o liberou pode ser causado não só pela produção do aleloquímico, mas também por sua liberação, degradabilidade e disponibilidade do mesmo no ambiente (METLEN; ASCHEHOUG; CALLAWAY, 2009).

A estação do ano em que o material vegetal é coletado é um dos principais fatores que interferem no metabolismo secundário da espécie, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos aleloquímicos não é constante durante todo o ano (NETO; LOPES, 2007). Na literatura são relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais (PAULUS et al., 2013), lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), cumarinas, saponinas (VIGO; NARITA; MARQUES, 2004), alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (NETO; LOPES, 2007).

Fatores fisiológicos como atividade fotossintética, comportamento estomático, mobilização de reservas, expansão foliar, reprodução e crescimento podem ser alterados por algum tipo de estresse e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (EVANS, 2002). Alguns fatores climáticos como, por exemplo, a incidência solar, temperatura e pluviosidade podem ser responsáveis pela alteração dos metabólitos (LOPES; NETO, 2007; BEZERRA et al., 2013). Baixas concentrações de nutrientes no solo também podem induzir a produção de alguns metabólitos secundários ou ainda ampliar a produção de metabólitos secundários produzidos em baixas quantidades, a intensidade luminosa também pode interferir nesse aspecto (THARAYILL et al., 2009).

Outro fator que contribui para as diferenças observadas na produção de metabólitos secundários, tanto quantitativa quanto qualitativamente, é o órgão vegetal, uma vez que a planta é capaz de produzir compostos metabólitos em todos os seus órgãos (ALVES et al., 2002). A forma de liberação desses compostos nos diferentes órgãos vegetais é bastante variável, podendo ser por volatilização de compostos aromáticos, lixiviação dos tecidos ou ainda pela dissolução em água (GEMIN, 2011). Na literatura é possível encontrar alguns estudos que avaliam a diferença do efeito alelopático de extratos originados de diferentes órgãos vegetais observando diferentes respostas do organismo teste (ZAHED et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Em órgãos mais jovens é comum encontrar uma maior quantidade de metabólitos secundários uma vez que esses compostos atuam no controle da herbivoria, tornando o órgão em questão impalatável (SINIMBU; COLEY; LEMES, 2012).

Apesar de produzidos em todos os órgãos das plantas, muitos trabalhos relatam a produção de metabólitos secundários nas folhas (MACHADO et al., 2007; LIMA et al., 2013; SANTOS; LIMA, 2013; SILVEIRA et al., 2014; ROSA et al., 2013;). Pérez (2004) observou em folhas de *Digitalis obscura* menores concentrações de cardenolídeos, como o lanatosídeo A, na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por fase de decréscimo no

outono. Em folhas de erva de São João (*Hypericum perforatum*) foram observadas concentrações de hipericina e pseudo-hipericina 30 vezes maiores no verão em relação ao inverno (SOUTHWELL; BOURKE, 2001). Lopes; Neto (2007) salientam que estudos de sazonalidade podem ser confundidos com alterações hormonais, devendo ser considerados em conjunto. É observado também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos em geral, principalmente maiores quantidades de taninos (VOLZ; CLAUSEN 2001).

Espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca por substâncias bioativas, sendo que os mais encontrados são compostos fenólicos, taninos, terpenos, alcaloides e terpenos (SANTOS et al., 2007; PAWLOWSKI et al., 2012). Em Aroeira-salsa já foram identificados os compostos, flavonoides, taninos e óleos essenciais (SANTOS et al., 2007), que tem aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e perfumaria.

Os alcaloides e óleos essenciais, dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, são os compostos com o maior número de substâncias biologicamente ativas (SANTOS, 2010). Esses óleos são ricos em hidrocarbonetos monoterpênicos, alguns sesquiterpenos e fenóis, apresentando importantes propriedades medicinais, sendo utilizados como antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatórios e inseticidas. Além disso, os óleos essenciais podem atuar como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura e, devido a sua propriedade antimicrobiana são cada vez mais utilizados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícios como alternativa aos produtos sintéticos (SANTOS, 2010; CORRÊA, 2013).

Ressalta-se, os metabólitos secundários têm sua produção e concentração influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos como fotossíntese, comportamento estomático, mobilização de reservas, expansão foliar, reprodução e crescimento, que podem ser alterados por algum tipo de estresse e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário. Esse fato consiste em um obstáculo para a indústria, uma vez que a composição do metabolismo secundário pode variar de uma coleta para outra ou de uma região para outra, atrapalhando a obtenção de uma metodologia de extração adequada para a indústria. De fato, os metabólitos secundários representam a interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

2.3 Bioensaios e biotestes aplicados a estudos de alelopatia

A alelopatia pode interferir na germinação, conservação e dormência de sementes, crescimento e estabelecimento de plântulas e com isso influenciam a competição e o processo sucessional do ecossistema (YAMAGUSHI; GUSMAN; VESTENA, 2011). Os aleloquímicos tem sido utilizados atualmente no controle de plantas daninhas, porque apresentam interferência positiva no controle de plantas infestantes, auxiliando na condução de um manejo ecológico livre dos compostos prejudiciais dos herbicidas sintéticos (MALHEIROS; PERES, 2001; NASCIMENTO et al., 2012).

A maioria dos trabalhos que estudam o efeito alelopático de espécies vegetais avaliam bioensaios visando principalmente o efeito sobre a germinação e crescimento inicial de organismos-teste (ARAÚJO et al., 2013; BONFIN et al., 2013; GOMES et al., 2013; LIMA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; NUNES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014), porém muitos dos efeitos visíveis nesses parâmetros são sinais secundários de mudanças ocorridas no DNA que podem ser identificadas tanto citológica quanto citogeneticamente (PRATES et al., 2001). Na literatura pode-se encontrar alguns trabalhos que avaliam os efeitos citogenéticos de extratos vegetais em bioensaios (CARDOSO, 2010; MARSIGLIA et al., 2011; LUZ et al., 2012; PAWLOWSKI et al., 2012; SILVA; BOSSO).

Para a confirmação do efeito biológico de compostos produzidos por determinada espécie vegetal podem ser utilizados bioensaios laboratoriais, bioensaios em casa de vegetação ou em campo. Os bioensaios laboratoriais fazem usos de biotestes como ratos (MACHADO et al., 2007; GUIDOTI et al., 2014), insetos (LOPÉZ et al., 2011), vegetais (ROSA et al., 2013; NUNES et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014) e microorganismos (RODRIGUES et al., 2011; LIMA et al., 2013; MAMPRIM et al 2014) onde objetiva-se avaliar os efeitos dos compostos no metabolismo desses organismos.

Dentre os biotestes vegetais, na literatura encontra-se trabalhos com Alface (ARAÚJO et al., 2013; BONFIN et al., 2013; GOMES et al., 2013; LIMA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; NUNES et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014), Rabanete (ROSA et al., 2013), Pepino, Soja (NUNES et al., 2014), Salsa (BONFIN et al., 2013), Couve (JUCHEM et al., 2013), Sorgo (OLIVEIRA et al., 2013), Picão-preto (GOMES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013), Cebola (ARAÚJO et al., 2013; CÂNDIDO et al., 2013), Milho

(GOMES et al., 2013), Alfafa e Ipê (CIPRIANI et al., 2014) podendo, em alguns casos apresentarem mais de um bioteste em um mesmo trabalho.

Nos bioensaios, os principais parâmetros avaliados são: germinação (DE CONTI et al., 2011; BONFIN et al., 2013; CÂNDIDO et al., 2013; JUCHEM et al., 2013; NUNES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014), índice de velocidade de germinação (DE CONTI et al., 2011; BONFIN et al., 2013; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014) e alongamento de raiz (DE CONTI et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013; BONFIN et al., 2013; GOMES et al., 2013; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2013; NUNES et al., 2014). Ainda sim ainda pode-se encontrar outros parâmetros sendo avaliados com menor frequência, como por exemplo: biomassa fresca (DE CONTI et al., 2011; NUNES et al., 2014;), biomassa seca (BONFIN et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014), índice mitótico (BOSSO; CARDOSO, 2010; CÂNDIDO et al., 2013; SILVA), alterações nas estruturas cromossômicas (SILVA; BOSSO; CARDOSO, 2012), tempo médio de germinação (SILVEIRA et al., 2014), percentagem plântulas normais desenvolvidas (JUCHEM et al., 2013; NUNES et al., 2014), alongamento da parte aérea (GOMES et al., 2013; NUNES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013), alongamento do hipocótilo (DE CONTI et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013; LIMA et al., 2013), número de sementes mortas e sementes não germinadas (JUCHEM et al., 2013) índice de velocidade de emergência, percentagem de emergência (NASCIMENTO et al., 2013), além de aspectos micromorfológicos de plântulas (CIPRIANI et al., 2014).

Dentre estes biotestes a Alfaca tem sido uma boa opção uma vez que apresenta sensibilidade a compostos aleloquímicos, germinação rápida e homogênea, crescimento linear, baixa sensibilidade a diferenças de pH e de potencial osmótico (SOUZA, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que *S. molle* é uma espécie ruderal bastante difundida e amplamente explorada na medicina popular, bem como nos trabalhos de paisagismo e reflorestamento, o presente trabalho propôs-se a estudar as propriedades alelopáticas de diferentes órgãos desta planta e de populações com manejos distintos. O conhecimento da ação quimioecológica desta espécie é de grande importância, devido a seu uso no reflorestamento, pois a utilização dela para esse fim pode interferir nos processos sucessionais naturais, uma vez que pode influenciar na germinação e desenvolvimento de espécies nativas do mesmo habitat modificando assim a regeneração natural do ecossistema.

Além disso, gera a possibilidade de introduzir conhecimentos para a elaboração de bioherbicidas que possam colaborar com atividades agronômicas de produção orgânica, uma vez que a degradabilidade de compostos naturais tende a ser mais rápida que a degradabilidade de herbicidas convencionais. Pode-se detectar modificações no ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear que devido à universalidade do código genético, pode ser extrapolado para outros organismos, demonstrando que o material botânico tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula.

4 OBJETIVOS

Nesse tópico encontram-se expostos os objetivos geral e específicos do trabalho.

4.1 Objetivo Geral

Determinar se os extratos de *S. molle* provenientes de diferentes formas de extração, de diferentes órgãos da planta e produzidos a partir de populações sob condições diferentes de manejo apresentam efeito alelopático.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever o comportamento do bioteste Alface exposto aos extratos aquosos e etanólicos de diferentes órgãos vegetais e populações sob diferentes manejos de poda;
- b) Avaliar o efeito dos diferentes extratos, dos diferentes órgãos e populações sobre os aspectos germinativos e crescimento inicial do bioteste Alface;
- c) Observar possível efeito desses extratos sobre o material genético do bioteste por meio da avaliação do ciclo celular e de anormalidades cromossômicas de Alface.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. M.; ARRUDA, M. S. P.; SOUZA FILHO, A. P. S. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. *In*: SOUZA FILHO, A. P.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 79 -102. 2002.
- ARAÚJO, S. G. et al. Antioxidant and allelopathic activities of extract and fractions from *Rosmarinus officinalis*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, n. 1, p. 35. 2013.
- ASSEFA, G. et al. Effect of variety and harvesting anagement on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). **Animal Feed Science and Technology**. v. 144,n. 3 p. 242–256, 2008.
- BARBOSA, D. B. Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). **Instituto de Genética e Bioquímica**, Uberlândia, 2008.
- BENDAOUD, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**. v. 75, n. 6, p. 466- 472, 2010.
- BEZERRA, A. S. et al. Climatic parameters and variation of phenolic compounds in barley. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1546-1552, 2013.
- BONFIM, F. P. G. et al. Efeito de extratos aquosos de funcho na germinação e vigor de sementes de alface e salsa. **Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 7, n. 3, p. 218-222, 2013.
- BOTELHO, L. S. **Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), aroeira-pimenteira (*Shinus terebinthifolius*), aroeira-salsa (*Shinus molle*): incidência, efeitos na germinação, transmissão para plântula e controle**. 2006.114 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba-SP, 2006.
- CÂNDIDO, A. C. S. et al. Atividade fitotóxica de *Croton doctoris* S. Moore. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 645-652, 2013.
- CIPRIANI, F. A.; KAPLAN, A. C.; ISAIAS, R. M. S.; SOARES, G. L. G. Avaliação da Fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta e Ambiente**. v.2, n. 1, p. 1-7, 2014.

CORRÊA, J. B. et al. Rendimento do óleo essencial das folhas e frutos de uma espécie da família Anacardiaceae. In: Salão do Conhecimento, XXI Seminário de Iniciação Científica, 2013. **Anais...** Rio Grande do Sul:Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2013.

EVANS, W. C. Trease and Evans Pharmacognosy. **W. B. Saunders Company**, 15 ed. London, (s.n.) 2002. cap. 7.

INDERJIT, D. A.; WARDLE, R. K.; RAGAN, M. C. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 26, n. 12, p. 655-662, 2011.

JUCHEM, F. et al. Potencial alelopático de diferentes extratos de frutos de adubos verdes sobre a germinação de sementes de couve. In.: VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia, VII, 2013, Porto Alegre. **Anais...** Caderno de Agroecologia. Porto Alegre/RS, 2013.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 42, n. 3, p. 369-393, 2006.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A.G. Interferência: Competição e Alelopatia. In: **Ferreira, A.G. & Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed Editora. p. 251-262, 2004.

GEMIN, C.A.B. **Estudo fotoquímico e avaliação de atividades biológicas do extrato etanólico de *Acicarpa spathulata* R. Br. (Calyceraceae)**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GOMES, F. M. et al. Efeito alelopático da fitomassa de *Lupinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 81, n. 1, p. 48-56, 2013.

GUIDOTI, D. T. et al. Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar. **Revista brasileira de Biociências**, v. 12, n. 1, p. 52-55, 2014.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

- KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie**, Weinberg 3, 06120 Halle, v. 125, p. 58-60, 2001.
- LIMA, C. P. et al. The allelopathic and antifungal potentials of extract from leaves *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 4, p. 16-25, 2013.
- LÓPEZ, S. B. et al. Composition and Anti-insect Activity of Essential Oils from *Tagetes L.* Species (Asteraceae, Heleniaceae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 5286–5292, 2011.
- LORENZI, H.; SOUZA, C. V. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificar famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. São Paulo, p. 432, 2005.
- LUZ, A.C. et al. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.v. 14, n. 4, p. 635-642, 2012.
- MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. *In mice*: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 31,n. 8 p. 421-428. 2007.
- MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. *In*: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**.p. 503-523. 2001.
- MAMPRIM, A. P. et al. Effect of natural pesticides and plant extracts on biological parameters of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1451-1466, 2013.
- MARSIGLIA, J. D. C. et al. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza online**, v. 9, n. 1, p. 30-34, 2011.
- METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant Cell Environmental**, v. 32, p. 641-653, 2009.

NASCIMENTO, I.L. et al. Influência de partes vegetais do *Tamarindus indica* L. como efeito alelopático na germinação de alface. **Revista Agropecuária Científica do Semiárido**, v. 8, n. 4, p. 97-101, 2012.

NETO, L.G.; LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

OLIVEIRA, L. S. E. et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do Tinguá-RJ, Brasil- Metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, Ano 4, n. 17, p. 54-74, 2011.

OLIVEIRA, A. L. et al. Alelopatia de extratos de diferentes órgãos de mulungu na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 480-483, 2012.

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

PAULUS, D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura brasileira**, v. 31, n. 2, 2013.

PAWLOWSKI, A.; SOARES, G. L. G.; Inibição da germinação e do crescimento radicial de alface (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids) por extratos alcoólicos de espécies de *Schinus* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 666-668, 2007.

PAWLOWSKI, A. et al. Essential oils of *Schinus terebenthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodrepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 96-103, 2012.

PELL, S.K. Molecular systematic of the cashew family Anacardiaceae. Dissertation. **Faculty of the Louisiana State University**, 2004.

PÉREZ, R. L. et al. Seasonal cardenolide production and *Dop5βr* gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1869-1878, 2004.

PRATES, H. 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.

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.

RODRIGUES, A. C. F. et al. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, p. 250-257, 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.

SASSET, G. et al. Caracterização de diferentes populações de *Schinus molle* L. através de marcadores moleculares ISSR. In: Encontro de Jovens Pesquisadores, 2008, Caxias do Sul. **Anais...** Universidade de Caxias do Sul, setembro, 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolismos secundários. In.: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. ;PETROVICK, P.R. (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 209-216, 2001.

SANTOS, A. C. A. et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n 8, p. 735-745, 2004.

SANTOS, A. C. A. et al. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1014-1016, 2007.

SANTOS, A. C. A. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SCOPEL, R. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Schinus molle* L with co-solvents: mathematical modeling and antimicrobial applications. **Brazilian archives of boil and technology**, v. 56, n. 3, p. 513-519, 2013.

SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Evaluation of Citotoxicity of Propolis in Meristmatic Cell of *Allium cepa*. **Científica. Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 9, n. 1, p. 67-70, 2010.

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.

SINIMBU, G., COLEY, P.D.; LEMES, M.R. The antiherbivore traits on expanding leaves in the neo tropical tree *Inga paraensis* (Fabacea) vary with light availability. **Oecologia**, v. 170, p. 669-676, 2012.

SOUTHWELL, I. A.; BOURKE, C. A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). **Wollongbar Agricultural Institute**, v. 56, n. 5, p. 437-441, 2001.

SOUZA, S. A. M. Biotestes na Avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul. **Monografia de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas**, Universidade Federal de Pelotas, p. 89, 2005.

THARAYIL, N. et al. Dual purpose secondary compounds: phytotoxin of *Centaurea diffusa* also facilitates nutrient uptake. **New Phytology**, v. 181, p. 424-434, 2009.

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

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

VOLZ, T. J.; CLAUSEN, T. P.; THOMAS, A. Tannins in *Puccinellia arctica*: possible deterrents to herbivory by Canada geese. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, 2001.

YAMAGUSHI, M. Q.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Allelopathic effect of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. and of *Casearia sylvestris* Sw. on crops. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1361-1374, 2011.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I: Phytotoxicity of extracts of different structures of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)

Phyto of extr of diff struct of *S molle* L. (Anacardiaceae)

AUTHORS: Marina de Lima Nogueira¹, Simone Cristina do Santos¹, Nádia Alves Campos¹, Luiz Alberto Beijo², Sandro Barbosa¹

Artigo submetido ao periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências

ARTIGO II: Efeito alelopático de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Schinus molle* L. sob diferentes regimes de poda.

AUTORES: Marina de Lima Nogueira, Simone Cristina do Santos, Nádia Alves Campos, Luiz Alberto Beijo, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Bioscience Journal.

ARTIGO I: Phytotoxicity of extracts of different structures of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)

Phyto of extr of diff struct of *S molle* L. (Anacardiaceae)

AUTHORS: Marina de Lima Nogueira¹, Simone Cristina do Santos¹, Nádía Alves Campos¹, Luiz Alberto Beijo², Sandro Barbosa¹

Artigo submetido ao Periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências

Phytotoxicity of extracts of different structures of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)

Phyto of extr of diff struct of *S molle* L. (Anacardiaceae)

AUTHORS: Marina de Lima Nogueira¹, Simone Cristina do Santos¹, Nádía Alves Campos¹, Luiz Alberto Beijo², Sandro Barbosa¹

1. Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

2. Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, Centro, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

Sandro Barbosa

e-mail: sandrobiogen@gmail.com

address: Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências da Natureza, Sala V008A. Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, Centro, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

phone: (35) 3299-1379

Section of the Academy: **Biological Sciences**

Keywords: Allelopathy, American pepper, Cytotoxicity, Plant Bioassay.

ABSTRACT

This study tested the phytotoxicity and cytotoxicity of ethanolic and aqueous extracts of different structures of *Schinus molle* L. using seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L.) as plant model. The extracts were prepared from samples of leaves, inflorescence, green and ripe fruits collected in fields located in Alfenas, State of Minas Gerais, Brazil. The parameters assessed were, germination (G), germination velocity index (GVI), root elongation (RE), fresh biomass (FB), dry biomass (DB), percentage for seedlings (PS), mitotic index (MI) and chromosomal abnormalities (CA). According to results, for the aqueous extract, we found interactions between concentration and plant structures in relation to G, GVI, RE, DB, and CA. There was no statistically significant differences among structures in relation to the percentage of normal seedlings, except among concentrations. However, interaction for all parameters was statistically significant in relation to ethanolic extracts, except the chromosomal abnormalities. Therefore, the increasing of concentration leads to reduction of the parameters assessed, showing the dose dependence effect. The ethanolic and aqueous extracts of *S. molle* showed the phytotoxic effect.

Keywords: Allelopathy. American Pepper. Cytotoxicity. Plant Bioassay.

INTRODUCTION

Schinus molle L. is a plant species from Anacardiaceae family originating from Latin America. In Brazil it is found from the State of Minas Gerais to Rio Grande do Sul. Popular named as Aroeira-salsa, Aroeira-mansa or Aroeirinha, this plant species has a xerophytic habit, can survive in steep areas and dry environments, and has been used in popular medicine, landscaping and loggers purposes (Fenner et al. 2006), even in the phytoremediation (Pereira et al. 2013a).

In the pharmaceutical industry, *S. molle* has been important by having leaves and fruits containing essential oils with variety of properties such as antimicrobial, antioxidant, antifungal, antispasmodic, antipyretic, anti-inflammatory and cicatrizing (Martins 2014; Santos et al. 2007). In the chemical and ecological points of view, *S. molle* has great competition capacity against other plant species due to the biodynamic potential of its metabolites (Pawlowski and Soares 2007).

Plants, however, have capacity of competing with other plants and with other organisms using secondary metabolites, also called allelochemicals, and which play an important role in the species adaptation, and in the organization and composition of plant communities (Ferreira and Áquila 2000; Reigosa et al. 2013). Secondary metabolites are substances produced in small quantities by plants, and which may protect them against herbivory, pathogen attack, external influences, and may help them in competition with other plants, and favouring attraction of pollinators and seed dispersers (Neto and Lopes 2007).

Allelochemicals can be found in all plant organs, and can be liberated to the environment by leaching tissues, dissolved into water, either from aerial parts or from roots, and through volatilization of aromatic compounds (Rice 1984; Neto and Lopes 2007; Nascimento et al. 2012).

There are few papers explaining about biological effect of allelochemicals from *S. molle* (Zahed et al. 2010; Pawlowski et al. 2012). In this context to investigate the phytotoxic effect of secondary compounds of this plant species, as well as its effect toward cytogenetic aspects, may provide very important information about its use in the re-arborization of degraded areas or its potential use in bioherbicide production. Therefore, the aim of this work was to investigate the effect of different extracts from different structures of *S. molle*, in different concentration, in bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.).

METHODOLOGY

Sample collection

The plant material was collected in Alfenas, State of Minas Gerais, Brazil. Collections were performed from September to November 2012 in areas located between (21°25'44"S and 45°56'49"W), and at 768m of mean altitude. Ripe leaves completely expanded were collected in the absence of any reproductive structure. Inflorescence were collected during flowering and fruits in different stages (green and ripe fruits). The dried specimen with fertile material is available in the UALF herbario of the Federal University of Alfenas, under the number 2529.

All collected material was dried in a hothouse at 40°C until mass stabilization. Then, was triturated, sieved at 20 fine sieve in order to obtain the ethanolic and aqueous extracts. The ethanolic extract was prepared by macerating and adding pure ethanol in the plant material until total exhaustion of the macerated and, then, concentrated in a rotary evaporator. The aqueous extract was prepared using infusion method, 5% concentrated, as outlined in Brasil (2010) and then lyophilized.

Phytotoxic test

The phytotoxicity test was carried out as outlined in Ribeiro et al. (2012) and Simões et al. (2013), using 3 replications of 50 seeds of lettuce (*L. sativa* cv. Grand rapids), in Petri dishes containing 5 ml of different concentrations of ethanolic and aqueous extracts of all structures of *S. molle* tested (0, 5, 10, 20 e 40 mg.mL⁻¹).

The experiment was performed in the germination chamber under 12 hours photoperiod at 25°C. Germination was assessed each 12 hours during 7 days, which allowed determining the germination velocity index, as follows:

$$GVI = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$
 where: GVI = germination velocity index; G = number of seeds germinated in the *i* counting (*i* = 1, 2, 3,..., n), and N = number of days until the *i* counting (*i* = 1, 2, 3,..., n).

In the 7th day, were assessed the germination (G), normal seedlings (NP), root elongation (RE), and fresh biomass (FB). For measuring RE, FB and total dried biomass (DB), were used 10 normal seedlings randomly selected from each Petri dish, which had essential structures in the perfect development stage. In cases of Petri dishes with less than 10 normal seedlings, was calculated the mean weight of the existing normal seedlings. After weighting the FB, seedlings were placed into hothouse with air circulation at 45°C until stabilization of masses and assessing DB.

Cytotoxicity test

The experiment was performed aiming to assess the effect of *S. molle* extract in the cell cycle, and chromosomal complement of the test-plant as outlined in Ribeiro et al. (2012) and Pereira et al. (2013b). Thirty seeds of lettuce were incubated in Petri dishes containing 3 mL of ethanolic and aqueous extracts, in the same conditions of the phytotoxicity test. Then, 3000

cells per treatment were checked aiming to assess the mitotic index (MI) and chromosomal abnormalities (CA) as described in Andrade-Vieira et al. (2014). The assessed CA were chromosomal bridges, micronucleus, missing chromosomes, C-metaphase and sticky chromosomes.

Data analysis

Two experiments were performed in completely randomized blocks, with three replications; one aiming to test the effect of aqueous extract, and another aiming to test the effect of ethanolic extract. Were both in 4×5 factorial scheme, with four plant structures (leaf, inflorescence, green fruit, and ripe fruit), and five concentrations (0, 5, 10, 20 and 40 mg.mL⁻¹).

Analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine statistical significance of means of plant structures. Normality test was run and, when data were considered with no Gaussian normal distribution were transformed in order to attend the assumptions of ANOVA through square root transformation. Means were compared by Scott-Knot test at 5% significance level using R statistical software (R CORE TEAM, 2013). For assessing the effect of concentration, regression models were adjusted in all cases that was possible.

RESULTS

When seeds of lettuce were exposed to aqueous extracts of *S. molle*, we found the effect of interaction among structures and extracts concentration for GVI ($p=0.0015$), G ($p=0.0025$), RE ($p=0.0029$) and DB ($p<0.0001$). There was no interaction among variation sources ($p=0.17$) for FB. However when concentration ($p<0.0001$) and extract ($p=0.011$)

were assessed separately they were statistically significant. For NP there was no interaction ($p=0.16$), but was found statistically significant difference only among concentrations ($p<0.0001$).

Aqueous extracts obtained from ripe fruits had the least interferences, in relation to G, GVI, RE and DB (Table 1). In relation to G, the effect of extracts obtained from plant structures were only different at 20 and 40 mg.mL⁻¹. For all other concentrations, all extracts had the same interference pattern. At 20 mg.mL⁻¹, the extract obtained from green fruits had the highest negative effect in relation to G. For 40 mg.mL⁻¹ the highest interferences were found in the extracts obtained from leaves and inflorescence (Table 1).

Table 1 - Mean of Germination (%), Germination Velocity Index, Root Elongation (mm) and Dry Biomass (mg) of *L. sativa* exposed to different concentrations of aqueous extracts obtained from different plant structures.

PLANT STRUCTURE	CONCENTRATIONS (mg.mL ⁻¹)				
	0	5	10	20	40
Germination (%)					
Ripe Fruit	93 a	97 a	100 a	91 a	33 a
Green Fruit	97 a	97 a	91 a	71 b	45 a
Leaf	100 a	96 a	91 a	86 a	9 b
Inflorescence	98 a	98 a	95 a	96 a	21 b
Germination Velocity Index					
Ripe Fruit	23,55 a	23,26 a	21,13 a	13,97 a	2,2 a
Green Fruit	22,87 a	22,62 a	18,52 a	9,67 b	2,17 a
Leaf	23,47 a	16,32 b	10,42 b	4,76 c	0,39 a
Inflorescence	21,63 a	18,97 b	13,57 b	4,75 c	1,09 a
Root Elongation (mm)					
Ripe Fruit	40,71 a	26,03 a	19,91 a	3,33 a	3,43 a
Green Fruit	49,93 a	20,27 a	8,92 b	3,35 a	0,00 a
Leaf	47,39 a	12,21 b	7,56 b	5,25 a	0,00 a
Inflorescence	46,28 a	20,82 a	15,43 a	8,21 a	0,00 a
Dry Biomass (mg)					
Ripe Fruit	0,081 a	0,085 a	0,093 a	0,083 a	0,059 a
Green Fruit	0,092 a	0,089 a	0,083 a	0,069 a	0,000 b
Leaf	0,086 a	0,084 a	0,081 a	0,074 a	0,000 b
Inflorescence	0,077 a	0,081 a	0,071 a	0,068 a	0,003 b

Averages followed by the same letter in the column do not differ one another by Scott-Knot test at 5% of significance level.

For GVI and RE was possible the distinction between the structures tested even at the lowest concentration of extracts. However, in high concentrations there was no statistically significant differences. This was probably due to high interference of the high concentrations. Indeed, for GVI, means were close to zero and, for RE, were statistically equal to zero, both at 40 mg.mL^{-1} . In relation to GVI, the greatest reductions were found in extracts obtained from leaves and inflorescence and, in relation to RE, was found in extracts obtained from leaves and green fruits (Table 1).

The DB was found to be less sensitive for differences among structures, with statistically significant differences only at 40 mg.mL^{-1} , when obtaining of seedlings was almost null (Table 1). For FB, regardless the concentration, the least interference was found when the extract obtained from ripe fruits (1.1 mg) was considered. There was no statistically significant differences among extracts obtained from green fruits (0.89 mg), leaves (0.84 mg) and inflorescence (0.93 mg).

When seeds of lettuce were exposed to aqueous extracts obtained from different structures of *S. molle*, we found that the increasing of concentration leads to reduction in the response for all parameters, showing a dependent effect in relation to concentration (Figure 1).

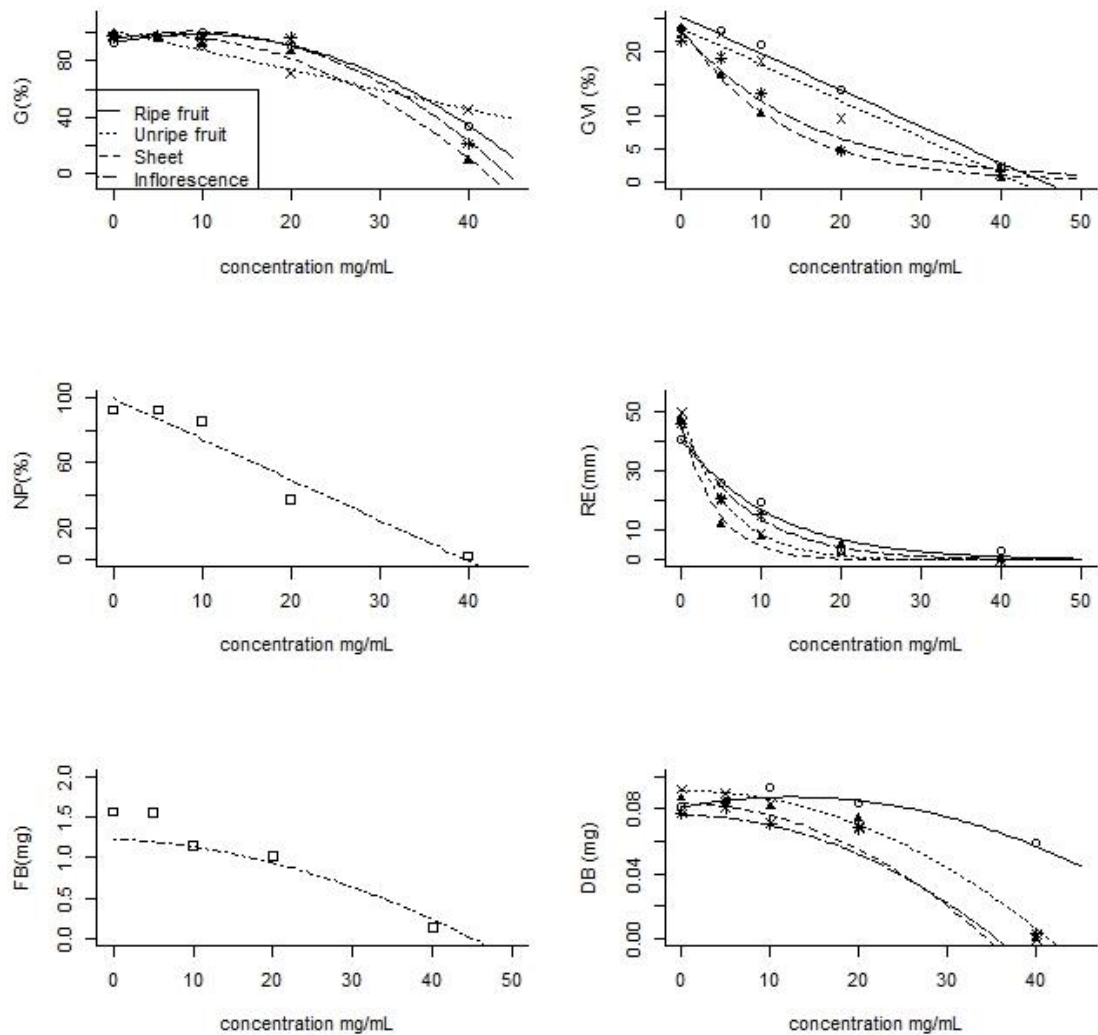


Figure 1- Relation among concentrations of aqueous extract of different structures of *S. molle*. In A G% (Ripe Fruit= $93,01+1,29X-0,069X^2$, $R^2=0,99$; Green Fruit= $100-1,4X$, $R^2=0,97$; Leaf= $96,74+0,65X-0,07X^2$, $R^2=0,98$; Inflorescence= $94,86+1,4X-0,08X^2$, $R^2=0,98$); B GVI (Ripe Fruit= $25,32-0,56X$, $R^2=0,98$; Green Fruit= $23,56-0,56X$, $R^2=0,96$; Leaf= $23,70^{(-0,08X)}$, $R^2=0,99$; Inflorescence= $23,13^{(-0,062X)}$, $R^2=0,95$); C NP% ($Y=43,33-1,19X$, $R^2=0,97$); D RE (Ripe Fruit= $41,02^{(-0,87X)}$, $R^2=0,97$; Green Fruit= $49,73^{(-0,173X)}$, $R^2=0,99$; Leaf= $46,96^{(-0,233X)}$, $R^2=0,97$; Inflorescence= $44,73^{(-0,116X)}$, $R^2=0,97$); E FB ($Y=1,239-0,0048X-0,0005X^2$, $R^2=0,98$) and F DB (Ripe Fruit= $0,081+0,001X-0,00004X^2$, $R^2=0,93$; Green Fruit= $0,0911-0,000053X^2$, $R^2=0,99$; Leaf= $0,083-0,00007X^2$, $R^2=0,99$; Inflorescence= $0,076-0,00006X^2$, $R^2=0,98$).

When seeds of lettuce were exposed to ethanolic extracts of *S. molle*, we found a significant effect of interaction among structures and extracts concentration for GVI ($p=0.0016$), G ($p=0.033$), NP ($p<0.0001$), RE ($p=0.0013$), FB ($p=0.014$) and DB ($p=0.004$).

In the highest concentration, we found high toxicity of the extract obtained from green fruits (Table 2).

Table 2 - Mean of germination (%), germination speed index, percentage of normal seedlings, and root elongation (mm). Fresh and dry biomasses (mg) of *L. sativa* exposed to different concentrations of ethanolic extracts obtained from different plant structures.

PLANT STRUCTURE	CONCENTRATIONS (mg.mL ⁻¹)				
	0	5	10	20	40
Germination (%)					
Ripe Fruit	100 a	100 a	98 a	94 a	74 a
Green Fruit	91 a	97 a	88 a	71 b	51 b
Leaf	98 a	93 a	90 a	85 a	41 b
Inflorescence	100 a	89 a	91 a	84 a	33 b
Germination Velocity Index					
Ripe Fruit	23,52 a	21,16 a	19,89 a	17,05 a	9,18 a
Green Fruit	23,52 a	20,79 a	18,32 a	11,56 b	3,84 b
Leaf	23,81 a	18,40 a	15,92 a	9,24 b	3,31 b
Inflorescence	22,18 a	20,70 a	18,06 a	10,95 b	4,41 b
Normal Seedlings (%)					
Ripe Fruit	87 a	92 a	91 a	83 a	21 a
Green Fruit	90 a	92 a	79 a	44 b	0 b
Leaf	96 a	88 a	82 a	51 b	5 b
Inflorescence	97 a	88 a	81 a	22 a	1 b
Root Elongation (mm)					
Ripe Fruit	43,34 a	42,26 a	38,24 a	18,73 a	6,21 a
Green Fruit	49,03 a	37,38 a	14,15 b	4,17 b	0,00 c
Leaf	52,68 a	34,55 a	23,82 b	7,88 b	2,19 b
Inflorescence	53,28 a	34,65 a	19,68 b	12,83 a	0,67 c
Fresh Biomass (mg)					
Ripe Fruit	1,18 a	1,32 a	1,16 a	1,19 a	0,77 a
Green Fruit	1,19 a	1,21 a	1,01 a	1,02 a	0,00 b
Leaf	1,22 a	1,02 a	1,07 a	0,82 b	0,25 b
Inflorescence	1,19 a	1,27 a	0,93 a	0,85 b	0,17 b
Dry Biomass (mg)					
Ripe Fruit	0,077 a	0,088 a	0,088 a	0,085 a	0,08 a
Green Fruit	0,084 a	0,082 a	0,08 a	0,084 a	0,00 c
Leaf	0,079 a	0,079 a	0,079 a	0,065 a	0,03 b
Inflorescence	0,084 a	0,077 a	0,069 a	0,072 a	0,023 b

Averages followed by the same letter in the column do not differ one another by Scott-Knott test at 5% of significance level.

With the increasing of extract concentration we found a reduction in the response for all parameters, showing a dependent effect in relation to concentration, except DB for the

extract obtained from ripe fruits. For DB, we did not find statistically significant differences, ie, the ethanolic extract of ripe fruits did not cause interference in the DB of the seedlings of lettuce (Figure 2F).

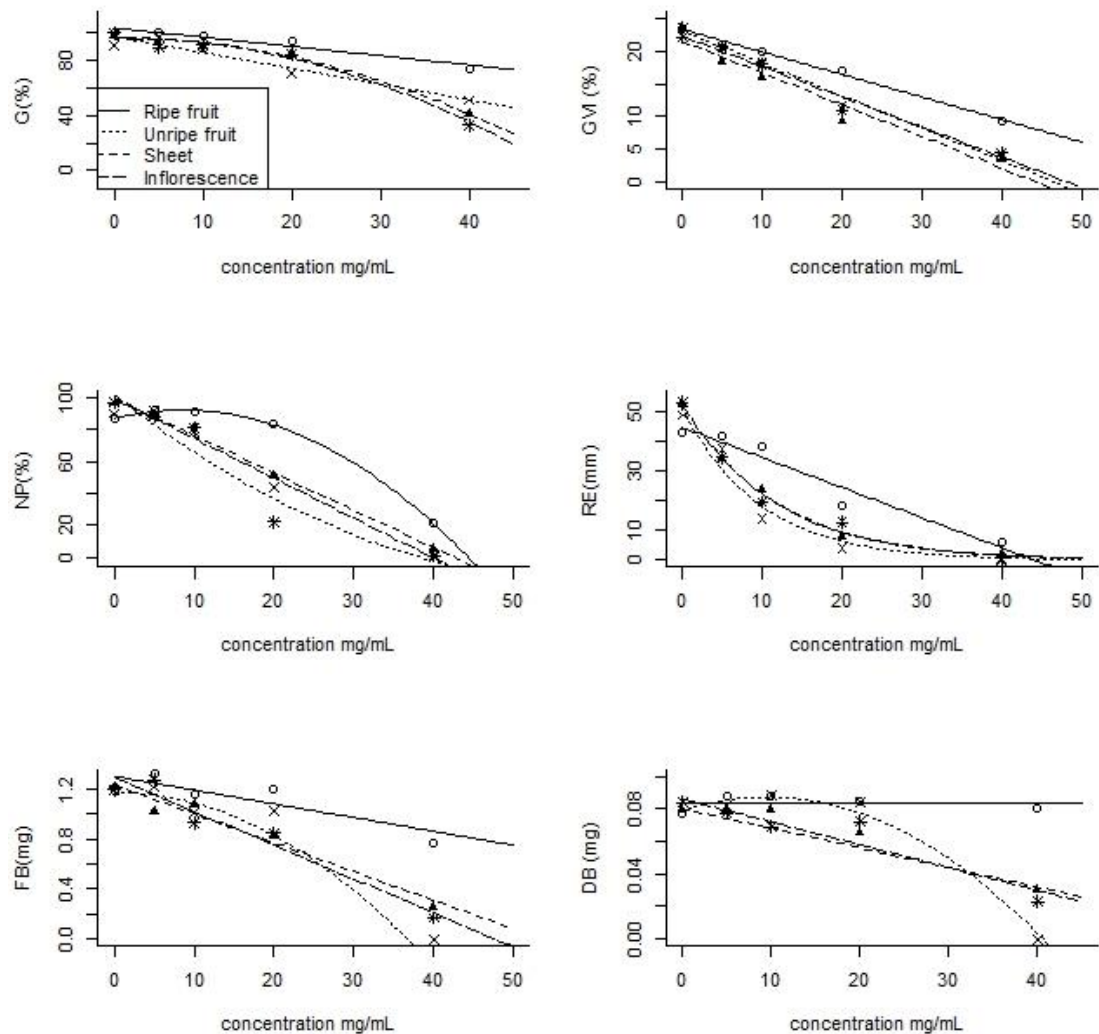


Figure 2 - Relation among concentrations of ethanolic extract of different structures of *S. molle*. In A G% (Ripe Fruit = $100-0,67X$, $R^2=0,92$; Green Fruit = $96,97-1,14X$, $R^2=0,93$; Leaf = $96,45-0,025X-0,034X^2$, $R^2=0,99$; Inflorescence = $95,72+0,09X-0,04X^2$, $R^2=0,97$); B GVI (Ripe Fruit = $4,88-0,045X$, $R^2=0,98$, Green Fruit = $4,91-0,074X$, $R^2=0,99$, Leaf = $4,74-0,075X$, $R^2=0,98$, Inflorescence = $4,82-0,075X$, $R^2=0,98$); C NP% (Ripe Fruit = $86,73+1,25X-0,07X^2$, $R^2=0,99$; Green Fruit = $100-2,34X$, $R^2=0,91$; Leaf = $99,63-2,34X$, $R^2=0,99$; Inflorescence = $99,45-2,49X$, $R^2=0,98$); D RE (Ripe Fruit = $6,88-0,11X$, $R^2=0,97$, Green Fruit = $51,37^{(-0,104X)}$, $R^2=0,95$; Leaf = $52,94^{(-0,085X)}$, $R^2=0,99$; Inflorescence = $52,85^{(-0,086X)}$, $R^2=0,98$); E FB (Ripe Fruit = $1,3-0,011X$, $R^2=0,75$; Green Fruit = $1,17-0,00087X^2$, $R^2=0,97$; Leaf = $1,23-0,023X$, $R^2=0,96$; Inflorescence = $1,29-0,027X$, $R^2=0,94$) e F DB (Ripe Fruit = $0,0836$ [there was no effect], Green Fruit = $0,079-0,00009X^2$, $R^2=0,97$; Leaf = $0,08-0,0012X$, $R^2=0,92$; Inflorescence = $0,086-0,014X$, $R^2=0,88$).

In relation to MI, the interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase were quantified. In relation to CA, for which treatment we assessed chromosomal bridges, micronucleus, missing chromosomes, C-metaphase and stickiness (Figure 3).

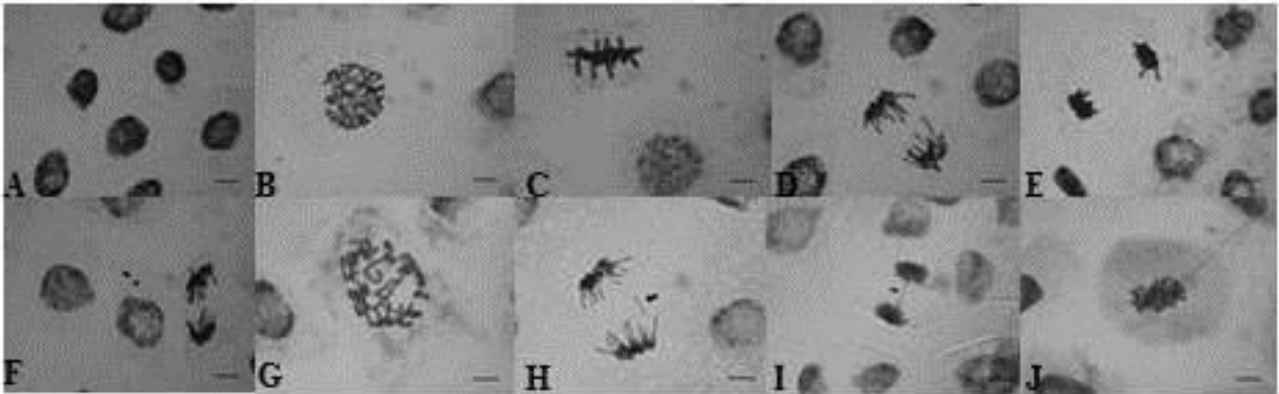


Figure 3 - Phases of cellular division used to obtain the mitotic index, where (A) interphase, (B) prophase, (C) metaphase, (D) anaphase, and (E) telophase. Chromosomal abnormalities quantified: (F) micronucleus, (G) C-metaphase, (H) missing chromosomes, (I) chromosomal bridges and (J) stickiness.

In the cytotoxicity test we found interaction among concentrations of extracts and structures, when assessed CA in meristematic tissues of roots exposed to aqueous extracts ($p < 0.0001$). There was no statistically significant interaction among concentrations and structures ($p = 0.46$), in relation to MI. However, either concentration ($p < 0.0001$) or plant structures ($p = 0.010$) were statistically significant, when assessed separately.

Mean of MI hints that, the aqueous extract also showed dependency in relation to concentration, so that the increasing of concentration led to the index reduction, adjusted to the regression model: $[Y = 35,69 - 1,07X \text{ (} R^2 = 0,98 \text{)}]$.

The highest reduction of the means of MI was found when meristematic cells were exposed to extracts of green fruits (27.4), regardless concentration, with no statistically

significant differences among extracts on ripe fruits (32.05), leaves (31.19) and inflorescence (30.77).

Percentage of abnormalities at 5 and 10 mg.mL⁻¹ was statistically equal. All extracts, at 10 mg.mL⁻¹, were lesser in relation to control, except the extract obtained from ripe fruits, which had increasing of CA in the same concentration (Table 3).

Table 3 - Mean of chromosomal abnormalities in meristematic cells of the radicular apex of *L. sativa* exposed to different concentrations of aqueous extracts obtained from different structures of *S. molle*.

PLANT STRUCTURE	CONCENTRATIONS (mg.mL ⁻¹)		
	0	5	10
Ripe Fruit	1,70 Ba	2,67 Aa	2,87 Aa
Green Fruit	1,87 Aa	2,40 Aa	0,90 Bb
Leaf	1,63 Ba	2,80Aa	0,35 Cb
Inflorescence	1,67 Aa	2,17 Aa	0,57 Bb

Averages followed by the same capital letter in the row, and small letter in the column do not differ one another by Scott-Knot test at 5% of significance level.

Differing to what we have observed for aqueous extracts, for ethanolic extract we found statistically significant interaction among concentrations and structures, in relation to MI ($p=0.0088$). However the same interaction was not significant, in relation to CA ($p=0.0650$), but statistically significant either for concentration ($p<0.0001$) or for plant structures ($p=0.0009$), when assessed separately.

The ethanolic extract obtained from leaves showed the lowest MI, regardless concentration (Table 4). All extracts showed negative effect, with no statistical differences among extracts concentration of the green fruit, leaf and inflorescence. However, was possible to obtaining root apex from different concentration, in relation to extract obtained from ripe fruits.

Table 4 - Percentage of mitotic index in meristematic cells of the radicular apex of *L. sativa* exposed to different concentrations of ethanolic extracts obtained from different structures of *S. molle*.

PLANT STRUCTURE	CONCENTRATIONS (mg.mL ⁻¹)		
	0	5	10
Ripe Fruit	36,37 Aa	22,50 Ca	30,83 Ba
Green Fruit	37,20 Aa	23,13 Ba	26,18 Ba
Leaf	35,10 Aa	16,10 Bb	13,73 Bb
Inflorescence	40,43 Aa	23,30 Ba	26,83 Ba

Averages followed by the same capital letter in the row, and small letter in the column do not differ one another by Scott-Knot test at 5% of significance level.

The percentage of abnormalities in the ethanolic extracts was greater for the extracts obtained from ripe fruits (1.81%) and leaves (1.68%) and, then, for the those obtained from green fruits (1.1%) and inflorescence (1.22%). There was no statistically significant differences of concentrations of ethanolic extracts among the control (1.81%) and 5 mg.mL⁻¹ (1.72%), but was greater than that of 10 mg.mL⁻¹ (0.83).

DISCUSSION

In order to outperform the abiotic pressures exerted in the environment, and the competition among plants, some species have developed defence mechanisms through biosynthetic pathways. They synthesize and accumulate a variety of secondary metabolites which play an important role in the ecological interactions. These metabolites, also called allelochemicals, may affect the establishment and development of plant species that occur in same areas (Ferreira and Aquila 2000; Santos 2007; Nascimento et al. 2012).

Allelochemicals, however, may be synthesized in all plant structures, varying in content and composition (Alves et al. 2002). Generally, young tissues tend to produce greater quantity of secondary metabolites than senescent tissues, even metabolites that cause toxicity

in the structure that produce them, what can help plants in avoiding the herbivory (Sinimbu et al. 2012). Then, the more evident toxicity in young tissues was also found in this study, since aqueous and ethanolic extracts of green fruits were found to have higher toxicity than in other structures, in the majority of parameters.

Zahed et.al. (2010), working with *S. molle* found that the essential oil of fruits collected at fruiting period showed less interference on seed germination and root elongation of *Triticum aestivum* L., in relation to the essential oil obtained from leaves. We found a similar result, in relation to the aqueous extract, where RE at 40 mg.mL^{-1} was equal to zero for the extract obtained from leaf, and equal to 3.43 mm for that obtained from ripe fruit.

Similar characteristics were found for both aqueous and ethanolic extracts, in relation to G of *L. sativa*, when exposed to high concentration of the extract, with 9% of germination for ripe fruits and 33% for leaves, in case of aqueous extract. It stand out, however, that even in different methodological procedures of extraction, all results show the potential phytotoxicity of *S. molle*.

Borella et al. (2010), investigating the allelopathic activity of leaf extract of *S. molle*, in seeds of *Raphanus sativus* L. cv. Crimson Gigante. They found reduction of the germination, germination velocity index, velocity germination and root elongation. These, showed the specie toxicity, and hint that the phytotoxic effect of *S. molle* is regardless of the methodology of compounds extraction, and of the structures used in the experiment. Besides, papers approaching about *Schinus spp.* also showed the toxic effect of this plant species against other plants (Pawlowski and Soares 2007; Pawlowski et al. 2012; Souza et al. 2007).

According to results, we found here that RE was more sensitive, since at 5 and 10 mg.mL^{-1} , either from ethanolic or from aqueous extracts, we found a differentiated effect among the structures. These is probably due to the fact of roots be in direct contact with allelochemical compounds in the substrate (Chon et al. 2000). Chung et al. (2001) also

suggest that due to this contact, the response may have high intensity in the parameters related to that structure. Moreover, different types of extracts may promote differentiated effects in the roots growth (Belinelo et al. 2008).

There are a relation between MI and RE (Andrade et al 2010), once that plant growth is directly related to cellular multiplication (Harashima and Schnittger 2010), This relations is also shown here, once there was reduction of MI and RE in all treatments.

As Andrade et. al. (2012); Pereira et al. (2013a); Andrade-Vieira et al. (2014), working with *L. sativa*, we also identified changes in the cell cycle, as well as we quantified structural abnormalities in the chromosomal complement, which are both aneugenic as clastogenic. These abnormalities may be directly related to toxicity of the plant specimen. Pawlowski et al. (2012), also found different structural abnormalities in the DNA of onion and lettuce, and they thought were caused by substances found in the essential oil of the *S. molle*.

Therefore, use of *S. molle* in projects of replanting, in degraded areas, has been recommended by this be a growing-fast plant species even in dry environments, ravines, rocky soils, and by presenting a high phenotypic plasticity (Backes and Irgang 2002). However, this use must be carefully seen in case of working in regions where this plant species is exotic, since this research is about characterization of its phytotoxicity.

CONCLUSIONS

All assessed parameters showed phytotoxic effect of *S. molle*. Furthermore, the concentrations of ethanolic and aqueous extracts were dependent for the majority of the plant structures, except the ethanolic extract of the ripe fruits, in relation to dry biomass, which did

not have any interference. Among leaves, inflorescence, green fruits, and ripe fruits; the green fruits had the highest toxicity. Therefore, *S. molle* was phytotoxic in the experiment involving lettuce, regardless the methodology used in the extraction of compounds and plant structures.

REFERENCES

Alves SM, Arruda MSP, Souza Filho APS. 2002. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. In: Souza Filho AP, Alves SM Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p.79-102.

Andrade LF, Davide LC and Gedraite LS. 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotox Environ Saf* 73: 626-631.

Andrade-Vieira LF, Botelho CM, Laviola BG, Palmieri MJ, Praca-Fontes MM 2014. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. *An Acad Bras Cienc* 86: 373-382.

Backes P, Irgang B. 2004. Árvores cultivadas no Sul do Brasil: Guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas. Porto Alegre, Paisagem do Sul Porto, p.325.

Brasil. 2010. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, v.2/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, 560p.

Belinelo VJ, Czepak MP, Filho SAV, Menezes LFT, Jamal CM. 2008. Alelopatia de *Arctium minus Bernh* (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. *RC* 21: 12-16,

Borella J, Martinazzo EG, Aumonde T Z. 2011. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. Rev Bras Bioc 9: 398-404.

Chon SU, Coutts J H, Nelson CJ. 2000. Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. AGRON J 92: 715-720.

Chung IM, Ahn JK, Yun SJ. 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. CROP PROT 20: 921-928.

Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. REV BRAS CIENC FARM 42: 370-394.

Ferreira AG, Aquila M EA. 2000. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia vegetal. Rev Bras Fisiol 12: 175-204.

Harashima H, Schnittger A. 2010. The integration of cell division, growth and differentiation. Curr Opin Plant Biol 13: 66-74.

Martins MR, Arantes S, Candeias F, Tinoco M T, Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. J ETHNOPHARMACOL 151: 485-492.

Nascimento IL, Linhares PCF, Pereira MFS, Marajá P B, Torres SB, Ribeiro MCC. 2012. Influência de partes vegetais do *Tamarindus indica* L. como efeito alelopático na germinação de alface. ACSA 8: 97-101.

Neto LG, Lopes NP. 2007. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. QUIM NOVA 30: 374-381.

Pawlowski A, Soares GLG. 2007. Inibição da germinação e do crescimento radicial de alface (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids) por extratos alcoólicos de espécies de *Schinus* L. Rev Bras Bioc 5: 666-668.

Pawlowski A, Kaltchuk-Santos E, Zini CA, Camarão EB, Soares GLG. 2012. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodrepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. S AFR J BOT 80: 96-103.

Pereira MP, Pereira FJ, Corrêa FF; Oliveira C, Castro EM, Barbosa S. 2013a. Lead tolerance during germination and early growth of the Brazilian peppertree and the morpho-physiological modifications. Rev Cienc Agrar 56: 72-79.

Pereira MP Pereira FJ, DE Almeida Rodrigues LC, Barbosa S, DE Castro EM. 2013b. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. Agro@mbiente On-line 7: 36-43.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Reigosa M, Gomes AS, Ferreira AG, Borghetti F. 2013. Allelopathic research in Brazil. Acta bot bras 27: 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. Rev Bras Bioc 10: 220-225.

Rice EL 1984. Allelopathy. NewYork: Academic Press, p. 422.

Santos ACA, Rossato M, Agostini F, Almeida ML, Pauletti GF, Serafini LA, Moyna P, Dellacasso E. 2007. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul. Rev Bras Bioc 5: 1014-1016.

Simões MS, Madail RH, Barbosa S, Nogueira ML. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. Biotemas 26: 29-36.

Sinimbu G, Coley PD, Lemes MR. 2012. Do the antiherbivore traits os expanding leaves in the neo tropical tree *Inga paraensis* (Fabacea) vary eith light avaiability. Oecologia 170: 669-676.

Souza CSMD, Silva WLPD, Guerra AMNDM, Cardoso MCR, Barros Torres S. 2007. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. RVADS 2: 96-100.

Zahed N, Hosni K, Bramhim NB, Kallel M, Sebei H. 2010. Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oilstone heat germination. Acta Physiol Plant 32: 1221–1227.

RESUMO

Esse trabalho teve por objetivo testar a fitotoxicidade e citotoxicidade de diferentes órgãos de *Schinus molle* L. utilizando como bioteste sementes de Alface (*Lactuca sativa* L.). Para tanto foram realizadas coletas de folhas, inflorescências, frutos verdes e frutos maduro sem uma população localizada no município de Alfenas-MG. Após as coletas, foram preparados extratos etanólicos e aquosos de cada um dos órgãos coletados. Os parâmetros avaliados foram: germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), alongamento de raiz, biomassa seca, biomassa fresca, percentagem de plântulas, índice mitótico e anormalidades cromossômicas. Para os extratos aquosos foram observadas interações entre a concentração utilizada e as órgãos vegetais quanto aos parâmetros germinação, IVG, alongamento de raiz, biomassa seca e anormalidades cromossômicas. Quanto à percentagem de plântulas normais desenvolvidas, não foi observada diferença entre os órgãos vegetais testadas, sendo observada diferença apenas entre as concentrações testadas. Para os extratos etanólicos, a interação foi significativa para todos os parâmetros avaliados exceto anormalidades cromossômicas. Em todos os casos foi observado que o aumento da concentração leva a uma redução do parâmetro avaliado, sendo evidente o efeito dose dependente. As variáveis observadas evidenciaram o efeito fitotóxico dos extratos provenientes da espécie estudada.

Palavras-chave: Alelopatia. Aroeira-salsa. Bioensaio vegetal. Citotoxicidade.

ACKNOWLEDGMENTS

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (under PRODOC) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais for scholarships.

ARTIGO II: Efeito alelopático de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Schinus molle* L. sob diferentes regimes de poda.

AUTORES: Marina de Lima Nogueira, Simone Cristina do Santos, Nadia Alves Campos, Luiz Alberto Beijo, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Bioscience Journal.

RESUMO

Aroeira-salsa é originária do Peru, sendo encontrada em condição ruderal no Brasil. Os metabólitos secundários produzidos por essa espécie são responsáveis por sua ampla utilização na medicina popular e podem interagir com outras plantas e organismos presentes no ecossistema, podendo assim serem chamados de aleloquímicos. Assim sendo, esse trabalho tem por objetivo avaliar o efeito alelopático de aroeira-salsa utilizando Alface (*Lactuca sativa* L.) como bioteste. Para tanto foram feitas coletas de folhas de *S. molle* nas cidades de Alfenas e Nepomuceno. Para os testes de fitotoxicidade, cipselas de Alface foram colocadas para germinar em câmara de germinação tipo BOD à 25°C com fotoperíodo de 12 horas sob diferentes concentrações de extratos aquosos e etanólicos das folhas coletadas. O delineamento experimental foi em esquema fatorial (2 x 4), sendo dois extratos (aquoso e etanólico) e quatro concentrações (2,5; 5; 10 e 20 mg.mL⁻¹) no design experimental de blocos casualizados, sendo bloqueado a época de coleta. A análise estatística consistiu em análise de variância ($p < 0,05$), com o ajuste de modelos lineares quando possível e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott quando não foi possível ajustar o modelo. As variáveis analisadas foram germinação, índice de velocidade de germinação, porcentagem de plântulas normais, comprimento de raiz, biomassa fresca e biomassa seca. Foram avaliadas, ainda, alterações no ciclo de células meristemáticas do modelo usado. Foi observado um efeito concentração dependente em todos os parâmetros testados independente da população testada, com exceção da biomassa seca exposta ao extrato etanólico. No alongamento de raiz pode-se observar diferença entre os extratos já na menor concentração, evidenciando assim a sensibilidade do parâmetro para os metabólitos avaliados.

Palavras-Chaves: População. Fitotoxicidade. Citotoxicidade

INTRODUÇÃO

Muitas plantas são utilizadas indiscriminadamente pela população para fins medicinais, enquadrando-se, nesse mérito, a Aroeira-salsa que possui folhas e frutos produtores de óleos essenciais picantes, que são bastante utilizados por apresentarem metabólitos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatórias, antiespasmódicas, antipiréticas e cicatrizantes (SANTOS et al., 2007). Além de grande importância para tais fins, esses metabólitos apresentam funções fisiológicas no próprio metabolismo da planta e podem atuar interagindo com outras plantas, o que impacta o ambiente adjacente. Nesse contexto ecológico, essas substâncias químicas são denominadas aleloquímicos e são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (FERREIRA; AQUILA, 2000). Estes aleloquímicos são responsáveis pelo fenômeno quimioecológico denominado alelopatia e pode se referir a qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre outra (FERREIRA, 2004).

A produção de aleloquímicos pode variar em resposta a vários fatores e condições ambientais (KUTCHAN, 2001), como por exemplo fatores climáticos, incidência e intensidade solar, temperatura e pluviosidade (BEZERRA et al., 2013; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As baixas concentrações de nutrientes no solo também podem induzir a produção de determinadas substâncias ou ampliar a produção de outras que sejam produzidas em baixas quantidades (THARAYIL et al., 2009). Fatores fisiológicos como atividade fotossintética, comportamento estomático, mobilização de reservas, expansão foliar, reprodução e crescimento podem ser alterados por algum tipo de estresse e conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (EVANS, 2002). A época do ano em que o material vegetal é coletado também é um fator que interfere no metabolismo secundário da espécie, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos aleloquímicos não é

constante durante o ano, podendo apresentar variações sazonais que devem ser consideradas em estudos sobre o efeito dessas substâncias (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso danos mecânicos como poda e herbívora também levam a alterações na composição dos metabólitos secundários (MITHOFER; WANNER; BOLAND, 2005; KRUIDHOF, et al., 2014).

Diante do exposto o presente trabalho objetivou a avaliação do efeito alelopático de diferentes extratos de populações de *S. molle* sob diferentes regimes de poda e condições ambientais em *Lactuca sativa*.

METODOLOGIA

Obtenção do material botânico e extratos

O material botânico utilizado foram folhas completamente expandidas, coletadas nos meses de outubro de 2010, janeiro, abril e julho de 2011 (a fim de eliminar o possível efeito sazonal existente na produção de aleloquímicos) de duas populações distintas com diferentes regimes de poda, localizada nas cidades de Alfenas, MG, Brasil (21°26'S; 45°56'O) e Nepomuceno, MG, Brasil (21°15'S; 45°15'O). Sendo que a população de Alfenas-MG sofre efeito de poda constante pela prefeitura, a fim de não atrapalhar a rede elétrica da região enquanto a população de Nepomuceno não sofre poda durante o ano. Material seco foi depositado no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UALF) sob os n° 2530 e 2439, respectivamente.

O material coletado foi seco em estufa à 40°C até a estabilização das massas, triturado, tamisado em tamis n° 20 e na sequência foram obtidos os extratos etanólico e aquoso. O extrato etanólico foi preparado pelo processo de maceração, adicionando-se etanol absoluto ao material vegetal até a exaustão total do macerado. Em seguida o extrato foi concentrado

em evaporador rotatório. O extrato aquoso foi preparado pelo método de infusão na concentração de 5%, segundo Brasil (2010), sendo posteriormente liofilizado.

Testes fitotóxicos

Os testes de fitotoxicidade foram feitos de acordo com Ribeiro et al. (2012) e Simões et al. (2013) com adaptações, utilizando 3 repetições com 30 sementes de Alface (*L. sativa* cv. Grand rapids) em placas de Petri contendo 3 mL das diferentes concentrações (0, 2.5, 5, 10 e 20 mg.mL⁻¹) dos extratos etanólico e aquoso de *S. molle*.

O bioensaio foi conduzido em câmara de germinação tipo B.O.D., a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A germinação foi avaliada a cada doze horas pelo período de 7 dias a fim de se obter o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com a expressão: $IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + \dots + (Gn / Nn)$, em que, G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem; N1 = primeira contagem (1); G2 = número de sementes germinadas na segunda contagem; N2 = segunda contagem (2) e n = última contagem. No sétimo dia foram avaliados germinabilidade (G%), plântulas normais (PN%), alongamento de raiz (AR) e biomassa fresca (BF). Foram consideradas plântulas normais aquelas com os órgãos essenciais em perfeito estágio de desenvolvimento. Para AR foram medidas as raízes de 10 plântulas normais escolhidas aleatoriamente em cada placa de Petri. Após a pesagem da BF, as plântulas foram colocadas em estufa com circulação de ar à 45°C até a estabilização das massas para avaliação da biomassa seca total (BS). Nas avaliações de BF e BS foram pesadas 10 plântulas de cada placa de Petri quando existentes, caso a quantidade de plântulas normais do tratamento fosse inferior a 10, todas as plântulas normais foram pesadas e o valores obtidos divididos pelo número de plântulas pesadas.

Testes citogenotóxicos

O bioensaio para avaliar o efeito dos extratos de *S. molle* sobre o ciclo celular e o complemento cromossômico da planta-teste foi adaptado de Ribeiro et al. (2012) e Pereira et al. (2013). Foram incubadas 30 sementes de Alface, em placas de Petri contendo 3mL dos extratos etanólico e aquoso de *S. molle*, nas mesmas condições experimentais do ensaio de fitotoxicidade.

Foram avaliadas 3000 células/tratamento para a avaliação do índice mitótico (IM) e anormalidades cromossômicas (CA), conforme Andrade-Veira et al. (2014). As AC quantificadas foram, pontes cromossômicas, micronúcleos, cromossomos perdidos, C-metáfase e cromossomos pegajosos.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial (2x4), apresentando duas metodologias de extração (aquoso e etanólico), quatro concentrações (2.5, 5, 10 e 20 mg.mL⁻¹) e três repetições, sendo que os dados foram expostos em relação aos resultados obtidos no controle.

Os resultados, com exceção da germinação, foram submetidos à análise de variância (ANAVA), tendo todas as variáveis atendido às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos. Para comparar as médias dos diferentes extratos foi aplicado o teste de Scott-Knott e para avaliar o efeito das concentrações ajustaram-se modelos de regressão. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico R versão 3.0.2, conforme R Development Core Team (2013), sendo adotado, para todos os testes, o nível de significância de 5%.

Os resultados de germinação por não atenderem às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as médias foram avaliadas pelo teste Student-Newman-Keuls, a 5% de significância.

RESULTADOS

Quando sementes de Alface foram expostas aos extratos foliares de *S. molle* originários da população de Nepomuceno pôde-se observar o efeito da interação entre tipo de extrato e concentração sobre IVG ($p < 0,0001$), PN ($p < 0,0001$), AR ($p = 0,0073$) e BS ($p = 0,0332$). Para BF, IM e AC não houve interação entre as fontes de variação ($p = 0,59$; $p = 0,102$; $p = 0,262$, respectivamente), porém foram significativas em BF e IM tanto concentração ($p < 0,0001$; $p = 0,00002$, respectivamente) quanto tipo de extrato ($p = 0,039$; $p < 0,0001$). Já para AC só foi observada diferença entre as concentrações testadas ($p = 0,0153$).

Para os extratos provenientes da população de Alfenas foi observado um padrão semelhante, sendo observado interação sobre IVG ($p = 0,000034$), PN% ($p < 0,0001$), AR ($p = 0,0236$) e BS ($p < 0,0001$) e não observada sobre BF ($p = 0,3935$), IM ($p = 0,5313$) e CA ($p = 0,208$). Para IM foi observado diferença entre as concentrações ($p = 0,0147$) e entre os tipos de extratos ($p = 0,00238$) independentemente, já para BF e AC só foi observada diferença entre as concentrações ($p < 0,0001$; $p = 0,043$, respectivamente).

O parâmetro alongamento de raiz se mostrou o mais sensível aos compostos presentes no extrato aquoso pois apresentou reduções maiores do que no extrato etanólico já na menor concentração, independente da população de origem do extrato. Porém, na concentração de 20mg mL^{-1} quando avaliados os extratos obtidos a partir da população de Alfenas não foi observada diferença entre as metodologias de extração (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias de índice de velocidade de germinação (%), número de plântulas (%), alongamento de raiz (%) e biomassa seca (%) de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de extratos aquosos e etanólicos de duas populações. Sendo P1=Nepomuceno e P2=Alfenas.

Extrato	CONCENTRAÇÕES (mg.mL ⁻¹)							
	2,5		5		10		20	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Índice de Velocidade de Germinação								
Aquoso	98,85 a	97,80 a	93,99 a	94,39 a	82,36 a	76,27 a	37,45 b	29,80 b
Etanólico	94,23 a	92,28 a	89,44 b	87,21 a	83,63 a	78,76 a	69,40 a	59,20 a
Número de Plântulas								
Aquoso	100,17 a	99,60 a	96,51 a	100,46 a	95,55 a	88,26 a	14,21 b	20,90 b
Etanólico	100,76 a	100,21 a	98,76 a	100,18 a	98,80 a	96,79 a	89,34 a	73,50 a
Alongamento de Raiz								
Aquoso	42,40 b	41,65 b	31,46 b	25,51 b	19,97 b	18,88 b	5,20 b	7,33 a
Etanólico	75,54 a	67,13 a	73,11 a	71,12 a	66,77 a	46,84 a	24,91 a	17,47 a
Biomassa Seca								
Aquoso	10,91 a	10,91 a	9,83 a	11,13 a	10,56 a	10,48 a	4,69 b	7,87 b
Etanólico	10,01 a	10,23 a	10,14 a	10,12 a	9,18 a	10,64 a	8,53 a	9,80 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O extrato aquoso apresentou maior redução no índice de velocidade de germinação, número de plântulas e biomassa seca, independente da população estudada, na concentração de 20mg mL⁻¹. Entretanto, na concentração de 5 mg mL⁻¹ na população de Nepomuceno o menor índice de velocidade de germinação foi observado no extrato etanólico (Tabela 1).

Para biomassa fresca pôde-se observar diferença no comportamento das duas populações testadas, uma vez que na população de Alfenas não foi observada diferença entre as duas metodologias de extração testadas, enquanto na população de Nepomuceno o extrato aquoso apresentou uma menor interferência do que extrato etanólico (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias de Biomassa fresca (%), Índice mitótico (%) e Anormalidades Cromossômicas (%) de *L. sativa* exposta a extratos aquosos e etanólicos de duas populações. Sendo P1=Nepomuceno e P2=Alfenas.

Extrato	Biomassa Fresca		Índice mitótico		Anormalidades Cromossômicas	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Aquoso	8,59 a	8,03 a	91,06 a	85,64 a	58,44 a	65,04 a
Etanólico	7,63 b	7,59 a	56,64 b	65,15 b	68,75 a	70,60 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Nos dados de índice mitótico o comportamento das duas populações testadas foi similar, sendo que as maiores reduções foram observadas no extrato etanólico em relação ao extrato aquoso (Tabela 2).

Quando cipselas de Alface foram expostas aos extratos aquosos e etanólicos de *S. molle* provenientes da população de Nepomuceno pôde-se observar um efeito concentração dependente, no qual com o aumento da concentração observa-se uma diminuição da resposta. Esse comportamento foi diferente apenas para os dados obtidos de biomassa seca de Alface exposta ao extrato etanólico, que não apresentou diferença entre as concentrações testadas, sendo que as médias representaram 9,46% da biomassa observada no controle (Figura 1).

Comportamento similar foi observado quando sementes de Alface foram expostas aos extratos provenientes da população de Alfenas (população que sofreu efeito de poda constante). Não foi observada diferença entre as concentrações de extrato etanólico em biomassa seca, enquanto nas demais concentrações observou-se um efeito concentração dependente (Figura 2).

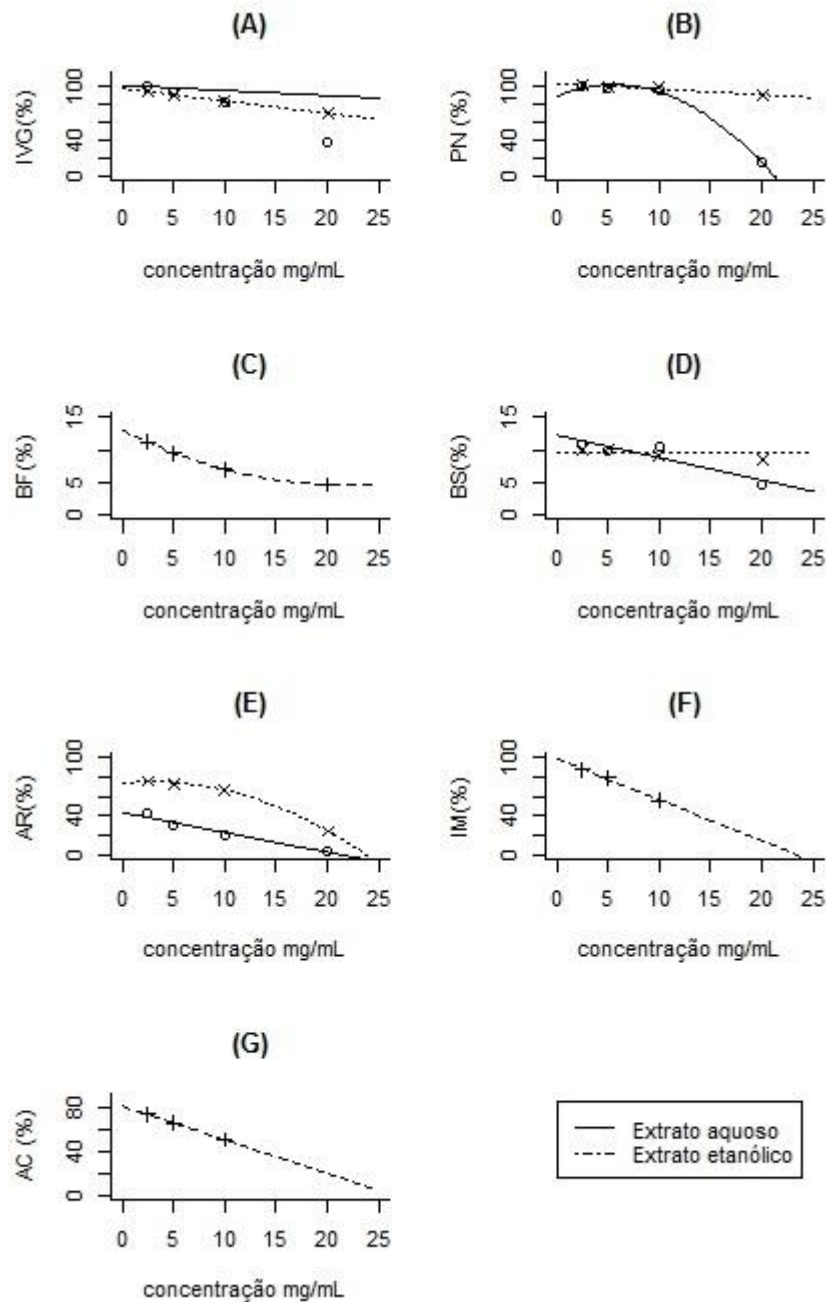


Figura 1- Relação entre concentrações de extrato aquosos e etanólicos de folhas de *S. molle* coletadas em uma população localizada na cidade de Nepomuceno. Em A IVG% (Aquoso= $100,738-0,57554X-0,129315X^2$, $R^2=0,99$; Etanólico= $97,19518-1,38833X-0,6337X^2$, $R^2=0,91$); B PN% (Aquoso= $88,4735+4,6395X-0,4177X^2$, $R^2=0,99$; Etanólico= $102,86-0,6337X$, $R^2=0,91$); C BF% ($Y=12,99-0,776X+0,0181X^2$, $R^2=0,99$); D BS (Aquoso= $12,2143-0,3427X$, $R^2=0,83$; Etanólico= $9,469$); E AR (Aquoso= $43,62029-2,01127X$, $R^2=0,95$; Etanólico= $73,601+0,96X-0,1695X^2$, $R^2=0,99$); F IM ($Y=98,179-4,1698X$, $R^2=0,99$); G AC ($Y=81,51-3,07X$, $R^2=0,99$).

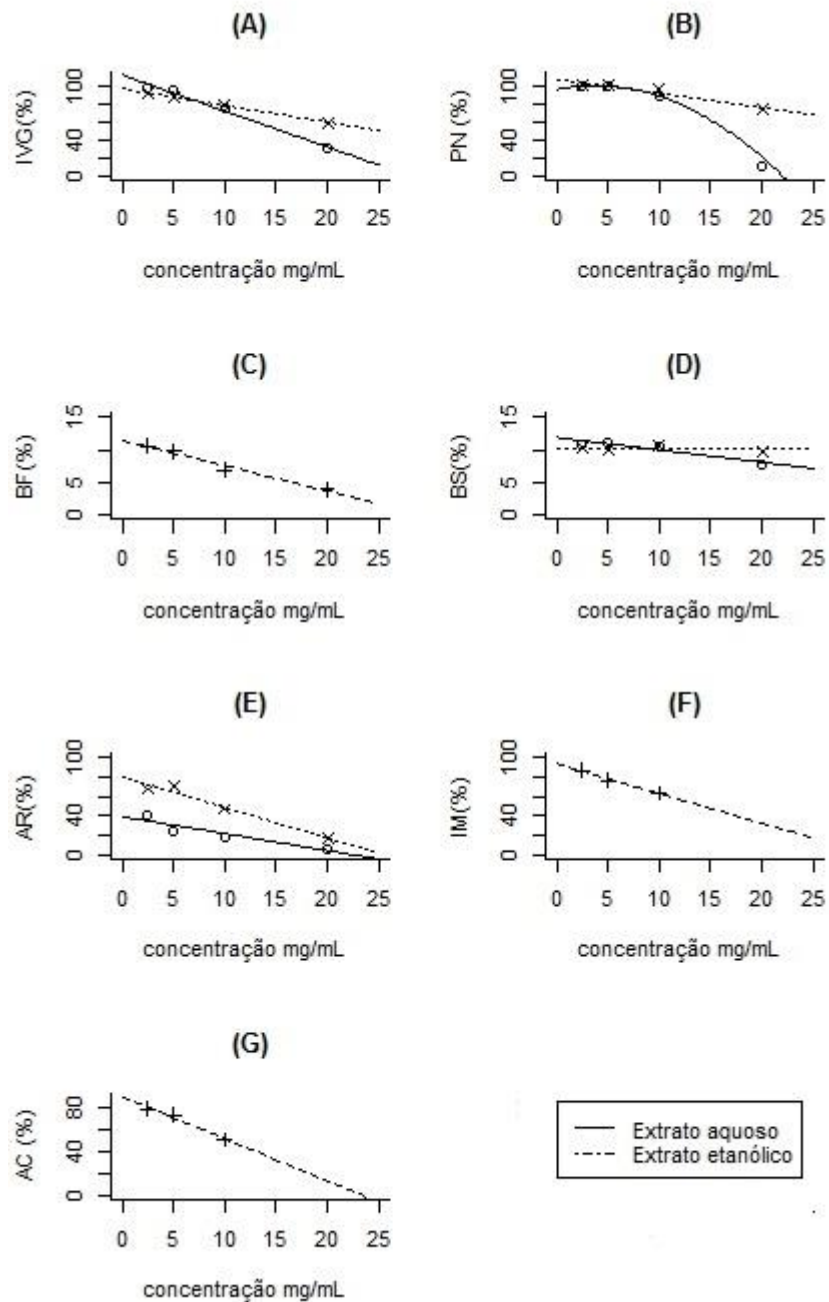


Figura 2- Relação entre concentrações de extrato aquosos e etanólicos de folhas de *S. molle* coletadas em uma população localizada na cidade de Alfenas. Em A IVG% (Aquoso= $112,185-4,012X$, $R^2=0,98$; Etanólico= $96,985-1,87X$, $R^2=0,99$); B PN% (Aquoso= $96,222+2,2356X-0,3X^2$, $R^2=0,99$; Etanólico= $107,58-1,59X$, $R^2=0,91$); C BF% ($Y=11,4242-0,385X$, $R^2=0,97$); D BS (Aquoso= $11,854-0,1866X$, $R^2=0,91$; Etanólico= $10,2029$); E AR (Aquoso= $39,428-1,7155X$, $R^2=0,85$; Etanólico= $79,74-3,104X$, $R^2=0,97$); F IM ($Y=92,96-3,012X$, $R^2=0,98$); G AC ($Y=90,27-3,84$, $R^2=0,98$).

Os dados de germinação da população de Nepomuceno e da população de Alfenas não apresentaram distribuição normal ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, respectivamente) nem homogeneidade dos resíduos ($p < 0.0001$; $p = 0.0232$), por isso foi necessário utilizar o teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) sendo as médias avaliadas pelo teste Student-Newman-Keuls, a 5% de significância (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias de Germinação (%), de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações extratos aquosos e etanólicos de duas populações. Sendo P1=Nepomuceno e P2=Alfenas.

Extrato	Concentração	P1	P2
Aquoso	2,5	99,90 a	100,18 a
Aquoso	5	100,18 a	100,18 a
Aquoso	10	99,63 a	99,63 a
Aquoso	20	90,16 b	87,37 b
Etanólico	2,5	100,18 a	99,90 a
Etanólico	5	99,90 a	99,63 ab
Etanólico	10	99,62 ab	98,79 ab
Etanólico	20	97,95 ab	90,45 b

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Apesar de germinação ser uma variável muito utilizada nos testes de alelopatia pode-se observar pouca variação entre as concentrações testadas, uma vez que mesmo na maior concentração houve uma germinação bem próxima do controle. A menor porcentagem de germinação foi observada em sementes expostas ao extrato aquoso da população de Alfenas na concentração de 20 mg mL^{-1} , que apresentou 87% de germinação em relação ao controle (Tabela 3).

DISCUSSÕES

Os compostos presentes nas plantas podem ter alta, média ou baixa polaridade, sendo que os compostos com alta polaridade tendem a ser mais ativos, podendo o efeito observado ser mais ou menos acentuado em relação ao parâmetro estudado (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS, 2010), sendo que um tipo de extrato pode interferir mais em um parâmetro fisiológico enquanto outro extrato pode interferir mais em parâmetros citotóxicos por exemplo. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou o efeito de dois extratos com alta polaridade (aquoso e etanólico), que evidenciaram o efeito alelopático de *S. molle*, sendo o efeito do extrato etanólico mais acentuado no índice mitótico e na biomassa fresca, enquanto que o extrato aquoso apresentou efeito mais evidente no índice de velocidade de germinação, número de plântulas normais, alongamento de raiz e biomassa seca.

Em todos os parâmetros onde foi possível ajustar modelo de regressão linear foi observado efeito concentração dependente, ou seja, com o aumento da concentração há uma diminuição da resposta analisada. O mesmo padrão foi observado por Borella et al. (2011) que avaliando o efeito alelopático de extrato aquoso de *S. molle* observaram uma redução proporcional na primeira contagem de germinação e no IVG.

Foi possível observar uma menor interferência na germinação que nos demais parâmetros testados. Em relação ao controle a maioria dos tratamentos teve resultados próximos a 100% de germinação, o que não aconteceu em nenhum dos outros parâmetros. Isso se deve possivelmente ao fato de a germinação ser um fenômeno discreto e os demais parâmetros avaliarem um processo mais complexo (FERREIRA; ÁQUILA 2000), possivelmente por interferências ambientais que bloqueiam ou retardam o andamento de processos metabólicos que podem interferir nesses parâmetros (FERREIRA, 2004).

Danos mecânicos como a poda constate (sofrida pela população de Alfenas) podem levar a uma resposta da planta semelhante àquela que ocorre pela herbivoria, levando o indivíduo a intensificar a produção de seus metabólitos secundários a fim de combater esse ataque (MITHOFER; WANNER; BOLAND, 2005; KRUIDHOF et al., 2014). Porém, assim como o presente trabalho, que não apresentou maior atividade alelopática na população com manejo de poda, Andrião (2010) também não observou aumento na concentração de compostos fenólicos de *Baccharis trimera* (carqueja) quando esta sofreu poda em relação ao manejo sem poda. Esse padrão pode ser consequência do fato das plantas com poda e sem poda estarem em condições edafoclimáticas similares, período chuvoso, radiação e temperatura semelhantes, sendo essas condições capazes de interferir na produção de metabólitos secundários (BEZERRA et al., 2013; LOPES; NETO, 2007). Possivelmente essas condições influenciaram mais fortemente a produção desses compostos do que o estresse causado pela poda mecânica.

O alongamento de raiz é consequência de uma combinação de fatores, dentre eles podemos citar principalmente a divisão e o alongamento celular (SILVA; DELATORRE, 2009). As plantas alvo, que sofrem um estresse imposto pela presença de compostos químicos presentes nos diferentes extratos podem responder aos mesmos de várias formas diferentes afetando o alongamento e divisão e causar alterações da diferenciação celular (POTTTER et al., 2007). Sendo assim os resultados de alongamento da raiz estão intimamente ligados aos resultados da divisão celular (PEREIRA et al., 2013; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) Porém os dados expostos no presente trabalho mostraram que o extrato etanólico apresentou uma redução mais acentuada na divisão celular, o que não pode ser observado no alongamento de raiz, no qual o extrato aquoso apresentou uma maior redução do que o extrato etanólico. Isso se deu possivelmente porque apesar dos compostos presentes no extrato etanólico reduzirem a germinação, os mesmos não reduzem o alongamento celular

como os compostos presentes no extrato aquoso que, apesar de mostrar uma redução menos efetiva na divisão celular, mostrou uma redução mais acentuada no alongamento da raiz, possivelmente por consequência de uma maior interferência no alongamento celular e não na divisão.

CONCLUSÕES

Extratos foliares de *S. molle* apresentaram efeito concentração dependente em todos os parâmetros testados, sendo observada diferença entre os métodos de extração utilizados (extrato aquoso e extrato etanólico).

O alongamento de raiz se mostrou o parâmetro mais sensível a diferentes aleloquímicos encontrados nos extratos aquosos e etanólicos.

REFERÊNCIAS

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

ANDRIÃO, M. A. MARCHA DE ABSORÇÃO DE MACRONUTRIENTES E ACÚMULO DE FENÓLICOS TOTAIS EM [*BACCHARIS TRIMERA* (LESS.) DC.] VAR. CPQBA-1, SOB DIFERENTES PODAS NO PLANTIO. 2010. 65f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura)** - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, UNESP, Botucatu, 2010.

BEZERRA, A. S. et al. Climatic parameters and variation of phenolic compounds in barley. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.9, p.1546-1552, 2013.

BORELLA, J., MARTINAZZO, E. G., & AUMONDE, T. Z. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9(3), p. 220-225, 2011.

BRASIL. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, v.2/Agência nacional de vigilância sanitária, ANVISA. 2010. 560p.

EVANS, W. C. Trease and Evans Pharmacognosy. **W. B. Saunders Company**, ed. 15, cap. 7, London, 2002.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 12, n. 1, p.175-204, 2000.

FERREIRA, A.G. Interferência: Competicao e Alelopatia. *In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed Editora. p. 251-262, 2004.

KRUIDHOF, H. MARJOLEIN, ET AL. "Mechanical wounding under field conditions: A potential tool to increase the allelopathic inhibitory effect of cover crops on weeds?" **European Journal of Agronomy**, v. 52, p. 229-236, 2014

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie**, Weinberg 3, 06120 Halle, vol. 125, p. 58-60, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

MITHÖFER, A.; WANNER G.; BOLAND W. "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission." **Plant Physiology**, v.137.3, p. 1160-1168, 2005.

PEREIRA, M.P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular **Revista Agro@mbiente**, v. 7(1), p. 36-43, 2013.

POTTERS, GEERT, et al. "Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?." **Trends in plant science**, v. 12.3, p. 98-105, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RIBEIRO, L.O. et al. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface - Protocolo RBB2139. **Revista Brasileira de Biociências**. v.10, p. 220-225, 2012.

SANTOS, A. C. A. et al. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1014-1016, 2007.

SILVA, ADRIANO ALVES, AND DELATORRE CARLA ANDRÉA. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista Ciência Agronômica**, v.8, p.152-163, 2009.

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

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS L. S.. "Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório—Revisão Crítica." **Planta Daninha**, v. 28.3, p. 689-697, 2010.

THARAYIL, N. et al. Dual purpose secondary compounds: phytotoxin of *Centaurea diffusa* also facilitates nutrient uptake. **New Phytology**, v. 181, p.424–434,2009.