



LÍVIA MARIA DE LIMA SANTOS

**PHITOTOXICITY OF *Mikania laevigata* SCHULTZ BIP. EX
BAKER EXCTRATS OR COUMARIN ON *Lactuca sativa* L.,
Bidens pilosa L. AND *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH**

**LAVRAS – MG
2018**

LÍVIA MARIA DE LIMA SANTOS

**PHITOTOXICITY OF *Mikania laevigata* SCHULTZ BIP. EX BAKER
EXCTRATS OR COUMARIN ON *Lactuca sativa* L., *Bidens pilosa* L. AND
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares para a obtenção do título de Doutor.

Prof^o. Dr. Adenilson Henrique Gonçalves
Orientador

Prof^o. Dr. Manuel J. Reigosa
Co-Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Santos, Livia Maria de Lima.

Phytotoxicity of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker
extracts or coumarin on *Lactuca sativa* L., *Bidens pilosa* L. and
Arabidopsis thaliana (L.) Heynh / Livia Maria de Lima Santos. -
2018.

110 p. : il.

Orientador(a): Adenilson Henrique Gonçalves.

Coorientador(a): Manuel Joaquim Reigosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Alelopatinos. 2. Metabolitos secundários. 3. Bioherbicida. I.
Gonçalves, Adenilson Henrique. II. Reigosa, Manuel Joaquim. III.
Título.

LÍVIA MARIA DE LIMA SANTOS

**PHITOTOXICITY OF *Mikania laevigata* SCHULTZ BIP. EX BAKER
EXCTRATS OR COUMARIN ON *Lactuca sativa* L., *Bidens pilosa* L. AND
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH**

**FITOTOCIDADE DOS EXTRATOS DA *Mikania laevigata* SCHULTZ BIP. EX
BAKER OU CUMARINA SOBRE *Lactuca sativa* L., *Bidens pilosa* L. E
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 08 de Março de 2018:

Dr. Itamar Ferreira de Souza	UFLA
Dra. Maria Fernanda G. V. Peñafior	UFLA
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dra. Michelle Concenição Vasconcelos	UFS
Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA

Profº. Dr. Adenilson Henrique Gonçalves
Orientador

Profº. Dr. Manuel J. Reigosa
Co-Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Ao senhor do universo, que me concede coragem e fé para superar os desafios diários.

À minha mãe Laudicéia Lima, que me ensinou o inconformismo, combustível essencial para buscar aquilo que me parece certo.

À minha irmã Larissa Mayra, a pessoa mais linda que tenho a oportunidade de partilhar a caminhada da vida.

Ao Rildo Matias, por ser meu companheiro e incentivador.

À minha avó, Gercina Barbosa (*in memoriam*), por me abrigar durante o período de faculdade, que até na pouca lucidez de seus últimos dias nunca se esqueceu de mim. Minha avó Bernadete de Lima e a tia Lauce, que tanto me ajudaram nos anos iniciais dos meus estudos.

Aos meus amigos, Bárbara, Fernanda e Renan pelos caminhos sugeridos, às preciosas ajudas e à amizade.

Ao Pará, que exporta gente da mais alta qualidade (Carol, Fernanda, Paulinha, Tainá, Diene e Luiz). À Bety e ao João, pelas longas conversas sobre livros, política, transformações do Box Cox e utilização do CorelDraw. A Kize, Maria Jéssica e Cristiane, companheiras de república. Ao Evaldo e a Annete pelo auxílio nos experimentos laboratoriais. À Kamila Rezende, pela ajuda com as análises enzimáticas. À Franciane e a Lidyane do departamento de química, pelas análises realizadas no HPLC.

À Katya Maria de Oliveira Sousa, à minha mentora no tema da Alelopatia. A Jarcilene Almeida Cortez pela solicitude. Ao Adenilson Gonçalves, pela orientação ao longo do doutorado. À professora Suzan Kelly, pelas preciosas ajudas. Ao professor e coordenador do curso de Plantas Medicinais José Eduardo, pelo incentivo e apoio.

Ao programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, a Universidade de Vigo, (Espanha), nas pessoas do Manuel J. Reigosa, Adela Sánchez Moreira e David por ter me recebido para o estágio internacional.

Ao POVO BRASILEIRO que paga seus impostos e a CAPES que direcionou parte da verba para o pagamento da minha bolsa.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O uso indiscriminado dos herbicidas sintéticos para combater as plantas invasoras de áreas cultivadas é responsável pela contaminação do ambiente, incluindo os seres humanos. Os extratos vegetais são ricos em metabólitos secundários (alelopatinos) que podem atuar como herbicidas eficazes com menores riscos ao ambiente. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxidez dos extratos aquosos e etanólicos oriundos das folhas de *M. laevigata* sobre as espécies *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa*, por meio de parâmetros como a germinação, crescimento inicial e a indução do estresse oxidativo *in vitro* (BOD) e em casa de vegetação. Bem como avaliar às alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas induzidas pela cumarina isolada [1,2- benzopirona] sobre *Lactuca sativa* e *Arabidopsis thaliana*. Foram averiguados à germinação total em porcentagem [G (%)], IVG (índice de velocidade de germinação) e o crescimento inicial. Quanto aos parâmetros bioquímicos, foram avaliados à atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX), os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e da peroxidação lipídica (MDA) de *L. sativa* e *B. pilosa*. Com base nos resultados dos bioensaios, observou-se que o extrato etanólico na concentração 3 mg mL⁻¹ de *M. laevigata*, testado em BOD induziu o estresse oxidativo levando a necrose. Em casa de vegetação, utilizando o método de pré-embebição, o extrato etanólico nas concentrações 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹, reduziu a germinação em *B. pilosa* e *L. sativa*, e estimulou a produção de peróxido de hidrogênio, seguido pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), que conseguiram reverter os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio em *L. sativa*. Já *B. pilosa* mostrou-se mais sensível ao extrato com maior produção do MDA. A 1,2-benzopirona afetou negativamente a germinação e o crescimento da raiz de *L. sativa*; o IC₅₀ (53 µM) aumentou o conteúdo de prolina livre (44%) e o IC₈₀ (85 µM) reduziu a concentração das proteínas solúveis totais (22%). Quanto à morfologia da raiz, *Arabidopsis thaliana* submetida ao IC₅₀ durante 14 dias, apresentou aumento da formação de raízes laterais e do número de pelos radiculares, formação de raiz ectópica, células e núcleos assimétricos. O estudo permitiu a ampliação do conhecimento acerca dos modos de ação, fisiológicos e bioquímicos, dos extratos vegetais de *M. laevigata* sobre uma planta hortícola (*L. sativa*) e uma invasora (*B. pilosa*) em duas situações de cultivo, *in vitro* e em casa de vegetação. Bem como da cumarina 1,2-benzopirona sobre duas plantas teste *L. sativa* e *A. thaliana*. Espera-se que a pesquisa possa prover subsídios à proposição de novos estudos sobre extratos vegetais e moléculas isoladas, com vistas a buscar bioherbicidas menos tóxicos ao ambiente.

Palavras-chave: Alelopatinos. Bioatividade. Modos de ação. Estresse oxidativo. Ambiente.

ABSTRACT

The indiscriminate use of synthetic herbicides to combat invasive plants in cultivated areas is responsible for the contamination of the environment, including humans. Plant extracts are rich in secondary metabolites (allelopathins) that can act as effective herbicides with lower environmental risks. The objective of this work was to evaluate the toxicity of the aqueous and ethanolic extracts from the leaves of *M. laevigata* on the species *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*, through parameters such as germination, initial growth and induction of oxidative stress in vitro (BOD) and in greenhouse. As well as evaluating the physiological, biochemical and morphological changes induced by coumarin isolated [1,2-benzopyrone] on *Lactuca sativa* and *Arabidopsis thaliana*. The total germination in percentage [G (%)], IVG (germination speed index) and initial growth were verified. Regarding the biochemical parameters, the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipid peroxidation (MDA) of *L. sativa* and *B. pilosa* were evaluated for antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX). Based on the results of the bioassays, it was observed that the ethanolic extract at the 3 mg mL⁻¹ concentration of *M. laevigata*, tested in BOD induced oxidative stress causing necrosis. In the greenhouse, using the pre-imbibition method, the ethanolic extract at concentrations 2.0 and 3.0 mg mL⁻¹ reduced the germination in *B. pilosa* and *L. sativa*, and stimulated the production of hydrogen peroxide, followed by increased activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX), which were able to reverse the harmful effects of reactive oxygen species on *L. sativa*. *B. pilosa* showed to be more sensitive to the extract with higher MDA production. 1,2-Benzopyrone negatively affected *L. sativa* root germination and growth; the IC₅₀ (53 μM) increased free proline content (44 %) and IC₈₀ (85 μM) reduced the concentration of total soluble proteins (22 %). As for root morphology, *Arabidopsis thaliana* submitted to IC₅₀ for 14 days showed increased lateral root formation and number of root hairs, ectopic root formation, asymmetric cells and nuclei. The study allowed to increase the knowledge about the physiological and biochemical modes of action of *M. laevigata* extracts on a horticultural plant (*L. sativa*) and an invasive plant (*B. pilosa*) in both in vitro and in a greenhouse assays. As well as the 1,2-benzopyrone coumarins on two test plants *L. sativa* and *A. thaliana*. It is hoped that the research may provide subsidies for the proposition of new studies on plant extracts and isolated molecules, in order to search for bioherbicides less toxic to the environment.

Keywords: Allelopathies. Bioactivity. Modes of action. Oxidative stress. Environment.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1- Rotas de síntese dos principais metabólitos secundários em plantas, destacando a cumarina.....18
- Figura 2- Possíveis mecanismos de liberação e transformação de alelopatinos.....20
- Figura 3-Rota biossintética da cumarina24

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figura 1 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos da *M. laevigata*. Extrato etanólico (A); Extrato aquoso (B); Padrão da cumarina 1,2-benzopirona (C) (concentração 4×10^{-5} mol/L⁻¹). Detecção em 280nm.....38
- Figura 2 - Comprimento do hipocótilo (mm); Comprimento da radícula (mm); Área foliar (mm²) e Matéria seca (g) de plântulas de *Lactuca sativa* (A, B, C e D) e *Bidens pilosa* (E, F, G e H) cultivadas na presença de soluções aquosas e etanólicas de *Mikania laevigata* e controle com água destilada.....41

ARTIGO 2

- Figura 1 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos da *M. laevigata*. Extrato etanólico (A); Extrato aquoso (B); Padrão da cumarina 1,2-benzopirona (concentração 4×10^{-5} mol/L⁻¹). Detecção em 280nm.....55
- Figura 2 - Efeito dos extratos de *M. laevigata* sobre a porcentagem de germinação em relação ao controle (100%); *L. sativa* (A); *B. pilosa* (B), medidos após 21 dias (N = 50).....56
- Figura 3 - Superóxido dismutase – SOD (A); Catalase – CAT (B); Peroxidase do ascorbato – APX (C); Teor de Peróxido de hidrogênio (D); Peroxidação lipídica (E) em *Lactuca sativa* submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em diferentes concentrações. Plântulas cultivadas durante 21 dias em casa de vegetação (N=5).60
- Figura 4 - Superóxido dismutase – SOD (A); Catalase – CAT; (B); Peroxidase do ascorbato – APX (C); Teor de Peróxido de hidrogênio (D); Peroxidação lipídica (E) em *Bidens pilosa* submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em diferentes concentrações. Plântulas cultivadas durante 21 dias em casa de vegetação (N=5).62

ARTIGO 3

- Figura 1-Curva dose-reposta da germinação e crescimento inicial da raiz de *L. sativa* (em relação ao controle) submetidas a concentrações crescentes de cumarina (0, 25, 50, 75, 150 e 300µM).76

Figura 2- Imagens das placas demonstrando o crescimento radicular da *L. sativa* submetida a concentrações crescentes de cumarina (0 - 300µM).77

Figura 3-Valores da eficiência quântica efetiva no FSII (Φ II) (A); Rendimento quântico da extinção não -fotoquímica induzida por luz (Φ NPQ) (A); Emissão da fluorescência (Φ NO) (B) e a Taxa de transporte de elétrons (ETR) (B), em plantas de *L. sativa* após tratamento com cumarina (1,2- benzopirona), 0µM (controle), 53µM (IC₅₀) e 85µM (IC₈₀). As plantas inteiras foram medidas quanto à fluorescência e os valores foram integrados posteriormente. Quinze medidas foram obtidas para cada parâmetro em cada tempo de medição, o que proporcionou um gráfico cinético para cada parâmetro ao longo do tempo.79

Figura 4-Imagens das plantas sob a eficiência quântica máxima do fotossistema II adaptados ao escuro (Fv/Fm) das folhas plantas da *L. sativa* tratadas com cumarina (1,2- benzopirona), 0µM (controle), 53µM (IC₅₀) e 85 µM (IC₈₀). Imagens obtidas do Imaging-PAM M-Series. Fv=fluorescência variável. Fm=florescência máxima. Fv/Fm=razão entre a fluorescência variável e a florescência máxima.79

Figura 5-Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (g.g⁻¹PS) em plantas de *L. sativa* com quatro semanas tratadas com 53µM (IC₅₀) e 85 µM (IC₈₀) de cumarina (1,2 – benzopirona). Clorofila a (Chla), Clorofila b (Chlb), Carotenoides (Cat).80

ARTIGO 4

Figura 1-Curva dose-reposta da germinação e crescimento inicial da raiz de *A. thaliana* (em relação ao controle) submetidas a concentrações crescentes de cumarina (0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 µM) durante 14 dias.....91

Figura 2-Imagens das plântulas da *A. thaliana* submetidas às concentrações da curva dose-resposta durante 14 dias, fotoperíodo de 8 h. B) Imagens superiores mostram *Arabidopsis thaliana* crescendo em placas de Petri quadrados e as imagens abaixo foram capturadas em microscópio eletrônico com amplificador. Escala: 500 µm.....92

Figura 3-Imagens das plântulas de *A. thaliana* tratadas com IC₅₀ da cumarina (14 µM). (A) Controle. (B) Plântula de 7 dias de idade tratada com IC₅₀ da cumarina, (C) Plântula de 14 dias tratada com IC₅₀ da cumarina. RE - raiz ectópica. Escala: 500 µm.93

Figura 4-Imagens do microscópio de luz (20x) de seções longitudinais semi-finas de ápices de raízes de *Arabidopsis thaliana* coloridas com azul de toluidina. (A) Controle, (B) Plântula de 7 dias de idade tratada com IC₅₀ da cumarina 1,2-benzopirona, (C) Plântula de 14 dias tratada com IC₅₀ da cumarina. n-núcleo, na-núcleo assimétrico, ca-célula assimétrica, mar- meristema apical da raiz.94

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1-Valores de pH e potencial osmótico das soluções de trabalho de *Mikania laevigata*.34

Tabela 2-Tempos de retenção e áreas do maior pico em cada extrato e do padrão da cumarina [1,2-benzopirona].38

Tabela 3-Porcentagem de germinação [G (%)] e valores de IC₅₀, índice de velocidade de germinação (IVG) de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* expostas a diferentes concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.39

Tabela 4-Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plântulas de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* submetidas a cinco concentrações (0; 0,1; 1,0; 1,5; 2 e 3 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.....42

Tabela 5-Peroxidação lipídica medida através dos teores de malonaldeído (MDA) em plântulas de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* submetidas a cinco concentrações (0; 0,1; 1,0; 1,5; 2 e 3 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.....43

ARTIGO 2

Tabela 1-Valores de pH (potencial hidrogeniônico) e PO (potencial osmótico) dos extratos das folhas da *M. laevigata*.53

Tabela 2-Características físicas e químicas da areia lavada utilizada para cultivar as espécies *L. sativa* e *B. pilosa* em casa de vegetação.....54

Tabela 3-Tempos de retenção e áreas do maior pico em cada extrato e do padrão da cumarina [1,2-benzopirona]56

Tabela 4-ANOVA dois fatores mostrando valores de F e nível de significância.....57

Tabela 5-Comprimento da radícula, hipocótilo, área foliar e massa seca total das plântulas de *L. sativa*. Medidos após 21 dias de cultivo em casa de vegetação (N = 10). Submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em cinco concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg mL⁻¹)58

Tabela 6-Comprimento da radícula, hipocótilo, área foliar e massa seca total das plântulas de *B. pilosa*. Medidos após 21 dias de cultivo em casa de vegetação (N = 10). Submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em cinco concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg mL⁻¹)58

ARTIGO 3

Tabela 1- Germinação total [GT (%)], Velocidade média da germinação (S), Velocidade de germinação acumulada (AS) e Comprimento total da raiz (CTR) de *L. sativa* submetidas a concentrações de cumarina (0-300 μM).77

Tabela 2-Peso fresco [Pf (g)], Peso seco [Ps (g)], Relação Ps/Pf, conteúdo relativo de água [CRA(mm)], Potencial hídrico (-) (Ψ_w ; Mpa), Potencial osmótico (Ψ_s ; Mpa) Condutância estomática (gs; $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Transpiração (E; $\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), Prolina livre ($\mu\text{mol. mL}^{-1}.\text{gps}$), proteínas solúveis totais (P.T.; $\mu\text{g. g}_{\text{PS}}^{-1}$) plantas adultas de *L. sativa* irrigadas com cumarina [1,2- benzopirona], 0 μM (controle), 53 μM (IC₅₀) e 85 μM (IC₈₀) durante quatro semanas. Os dados estão em porcentagem em relação ao controle.....78

ARTIGO 4

Tabela 1-Índices da germinação, Germinação total [GT (%)], Velocidade média da germinação (S), Velocidade de germinação acumulada (AS) e Comprimento total da raiz (CTR) da *A. thaliana* submetidas a concentrações de cumarina (0-24 μM).91

LISTA DE ABREVIATURAS

APX peroxidase do ascorbato

AS velocidade de germinação acumulada

CAT catalase

CLAE-DAD cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CRA conteúdo relativo de água

CTR comprimento total da raiz

E transpiração

ETR taxa de transporte de elétrons

g_s condutância estomática

GT taxa de germinação total

H₂O₂ peróxido de hidrogênio

IVG índice de velocidade de germinação

MDA malonaldeído (ou malondialdeído)

MF massa fresca

Mpa mega pascal

P.A. para análise

Pf peso fresco

Ps peso seco

Ps/Pf relação peso seco sobre o peso fresco

PVPP polivinilpirrolidona

S velocidade média de germinação

SOD superóxido dismutase

TCA tricloroacético

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Alelopatia e seus termos	16
2.2	Origem e função dos alelopatinos.....	17
2.3	Mecanismos de ação dos alelopatinos e uso na agricultura	20
2.4	Uso de plantas na obtenção de herbicidas	22
2.5	<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker e a síntese de cumarina	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS*	31
	ARTIGO 1- FITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DA <i>Mikania laevigata</i> Schultz ..Bip. ex Baker SOBRE <i>Lactuca sativa</i> L. E <i>Bidens pilosa</i> L	32
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Coleta do material vegetal.....	34
2.2	Obtenção dos extratos	34
2.3	Teste de germinação das sementes da <i>L. sativa</i> e <i>B. pilosa</i>	35
2.4	Bioensaio de crescimento das plântulas de <i>L. sativa</i> e <i>B. pilosa</i>	36
2.5	Determinação do teor de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica	36
2.6	Análise estatística.....	37
3	RESULTADOS	37
3.1	Crescimento inicial	39
3.2	Teor de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica (MDA).....	42
4	DISCUSSÃO	43
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ARTIGO 2- REDUÇÃO DO CRESCIMENTO INICIAL E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELOS EXTRATOS FOLIARES DA <i>Mikania laevigata</i> (Asteraceae) SOBRE <i>Lactuca sativa</i> E <i>Bidens pilosa</i> EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO	50
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Material vegetal	52
2.2	Preparo dos extratos.....	52
2.3	Experimento em casa de vegetação	53
2.4	Análise do estresse oxidativo.....	54
2.5	Análise estatística.....	54
3	RESULTADOS	55
3.1	Germinação e crescimento inicial de <i>L. sativa</i> e <i>B. pilosa</i>	56
3.2	Análises do estresse oxidativo	59
4	DISCUSSÃO	63

5	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
	ARTIGO 3- CUMARINA [1,2-BENZOPIRONA] INIBE A GERMINAÇÃO, ALTERA A CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA E OS TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS EM PLANTAS ADULTAS DE <i>Lactuca sativa</i>	70
1	INTRODUÇÃO.....	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1	Bioensaios de germinação e de crescimento radicular	72
2.2	Experimentos em plantas adultas.....	72
2.3	Fluorescência da clorofila <i>a</i>	73
2.4	Pigmentos fotossintéticos.....	73
2.5	Proteínas solúveis totais (P.T.).....	74
2.6	Prolina livre	74
2.7	Potencial hídrico e osmótico (Ψ_w e Ψ_s)	74
2.8	Peso seco (Ps), peso fresco (Pf), relação Ps/Pf e conteúdo relativo de água (CRA)	75
2.9	Condutância estomática (g_s) e transpiração (E).....	75
2.10	Análises estatísticas.....	75
3	RESULTADOS	76
4	DISCUSSÃO	80
5	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	ARTIGO 4- ALTERAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS NA RAIZ DE <i>Arabidopsis thaliana</i> CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO À CUMARINA	87
1	INTRODUÇÃO.....	88
2	MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1	Material vegetal e condições de crescimento	89
2.2	Curvas de dose-resposta e aquisição de imagem	89
2.3	Análise da estrutura das raízes da <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
3	RESULTADOS	90
4	DISCUSSÃO	95
5	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O uso excessivo de herbicidas sintéticos para o controle de plantas invasoras de áreas cultivadas pode resultar no surgimento de espécies resistentes (VYVYAN, 2002), contaminação ambiental (solo e lençol freático) e danos à saúde dos animais (ZANUNCIO et al., 2018). Quanto à resistência das plantas, foram registrados 487 casos, com 253 espécies (147 dicotiledôneas e 106 monocotiledôneas), em todo o mundo (HEAP, 2017). As Plantas invasoras desenvolveram resistência a 163 herbicidas diferentes. Com relatos de ocorrência em 92 culturas em 70 países (HEAP, 2017), aumentando os custos da produção agrícola e diminuindo o retorno líquido associado a cada cultura (GOPLIN et al., 2018).

Preocupações ambientais e vários efeitos adversos relacionados ao uso indevido de herbicidas estimulam a busca por novos métodos para equilibrar a boa produção agrícola com sustentabilidade ambiental. A alelopatia pode ser considerada uma boa alternativa, uma vez que é um mecanismo de interferência de uma planta sobre outra mediante a liberação de metabólitos secundários no ambiente (TRAVLOS et al., 2018).

Os alelopatinos (DIAS; DIAS, 2007), que desempenham atividade alelopática, causam inúmeras mudanças bioquímicas e fisiológicas na planta receptora, como: alterações no processo respiratório, fotossintético e nas relações hídricas; interferem na abertura e fechamento estomático; comprometem a estrutura e permeabilidade das membranas e da parede celular; modifica o processo de divisão e alongamento celular, dentre outros processos.

Os compostos que possuem atividade alelopática tem despertado interesse na comunidade científica (ZHANG et al., 2016; HISTER; TRAPP; TEDESCO, 2016) devido aos diversos mecanismos de ação desempenhados pelos alelopatinos, sendo considerados substitutos adequados para os herbicidas sintéticos, porque não possuem efeitos residuais ou tóxicos, embora a eficácia e a especificidade de alguns compostos sejam limitadas (CHENG; CHENG, 2015).

Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker é uma planta medicinal popularmente conhecida como “guaco”, que têm como marcadores químicos derivados do ácido cinâmico, como a cumarina simples [1,2 benzopirona] e o ácido *o*-cumárico, assim como o ácido caurenóico (BERTOLUCCI et al., 2008). De acordo com os relatos literários a cumarina [1,2 benzopirona] foi capaz de inibir o crescimento de células de cenoura em cultura de tecidos (ABENAVOLI et al., 2003); alterar a divisão celular da raiz e induzir a vacuolização em células de cebola (KUPIDŁOWSKA et al., 2001) e inibir o alongamento da raiz primária e aumentar as raízes laterais (LUPINI et al., 2016) do milho.

Em face do exposto, objetivou-se avaliar as alterações biométricas, bioquímicas, fisiológicas e anatômicas causadas pelos extratos, aquoso e etanólico, da *M. laevigata* em condições controladas (BOD) e em casa de vegetação, utilizando como plantas receptoras *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa*, seguida de testes com a cumarina [1,2- benzopirona] aplicada sobre *Lactuca sativa* e *Arabidopsis thaliana*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alelopatia e seus termos

A interferência das plantas sobre outras plantas adjacentes, mediante a liberação de substâncias para o ambiente, remonta a antiguidade. Os primeiros registros foram realizados por Demócrito 500 a.C e Theophrastus 300 a.C, os quais descreveram que *Cicer arietinum* exauria o solo e impedia o desenvolvimento da vegetação. Plínio em 1 d.C, também relatou que o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), a cevada (*Hordeum vulgare* L.), a ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) e a noqueira europeia (*Juglans regia* L.), provavelmente causavam injúrias às plantas da vizinhança (RICE, 1984).

De Candolle em 1832, por sua vez, descreveu o termo “cansaço das terras”, e ainda observou que em áreas de monoculturas plantadas durante anos seguidos, o “solo” passava a afetar o desenvolvimento da cultura. Entretanto, somente em 1909, ocorreu a primeira demonstração científica do fenômeno alelopático por Schreiner & Sullivan, que provaram que a redução no desenvolvimento de *Vigna unguiculata* foi devido à presença de compostos químicos.

Apesar do amplo relato sobre a interferência das plantas sobre outros sistemas biológicos o termo foi elaborado apenas em 1937 por Hans Molisch, a partir da junção de duas palavras gregas, *allelon* - mútuo e *pathos* – prejuízo. Segundo Molisch, “alelopatia é a capacidade das plantas produzirem substâncias químicas que liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento”. Rice (1984) definiu alelopatia como, “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Em 1971, Wittaker e Feeny criaram o termo aleloquímico, atualmente denominado como alelopatinos, e associaram a sua síntese com a necessidade da planta se adaptar ao ambiente. Grande parte dos alelopatinos é sintetizada via metabolismo secundário das plantas, e é liberada para o ambiente por meio de vários processos como a volatilização, lixiviação,

decomposição de resíduos e exsudação (processo de liberação de substâncias pelas raízes) (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; EL-WAKEIL, 2013). Um conceito de fundamental importância foi criado por Putnan e Duke (1978) que descreve o termo de planta “doadora”, aquela que libera os aleloquímicos no ambiente e interfere na planta “receptora”.

Estas substâncias têm a função de conferir alguma vantagem adaptativa ao organismo emissor da substância (SILVA et al., 2017), habilidade adquirida ao longo do processo evolutivo destas plantas. Segundo a International Allelopathy Society – IAS (1996), o termo alelopatia abrange o impacto positivo (estímulo) ou negativo (inibição) das plantas sobre as plantas vizinhas e/ou sua microbiota, mediante a produção de alelopatinas.

Miller (1996) classificou o efeito alelopático em dois modos de ação: autotoxicidade, que ocorre quando plantas de uma espécie liberam substâncias químicas que interferem na germinação e/ou crescimento de plantas da mesma espécie; e heterotoxicidade, quando uma planta produz substâncias que são tóxicas para germinação e/ou crescimento de plantas de outras espécies.

A autotoxicidade é um fenômeno importante no controle da densidade populacional em sistemas naturais. Alternativamente, a germinação pode ser adiada e isso irá regular o crescimento das mudas evitando a competição intraespecífica (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017).

2.2 Origem e função dos alelopatinas

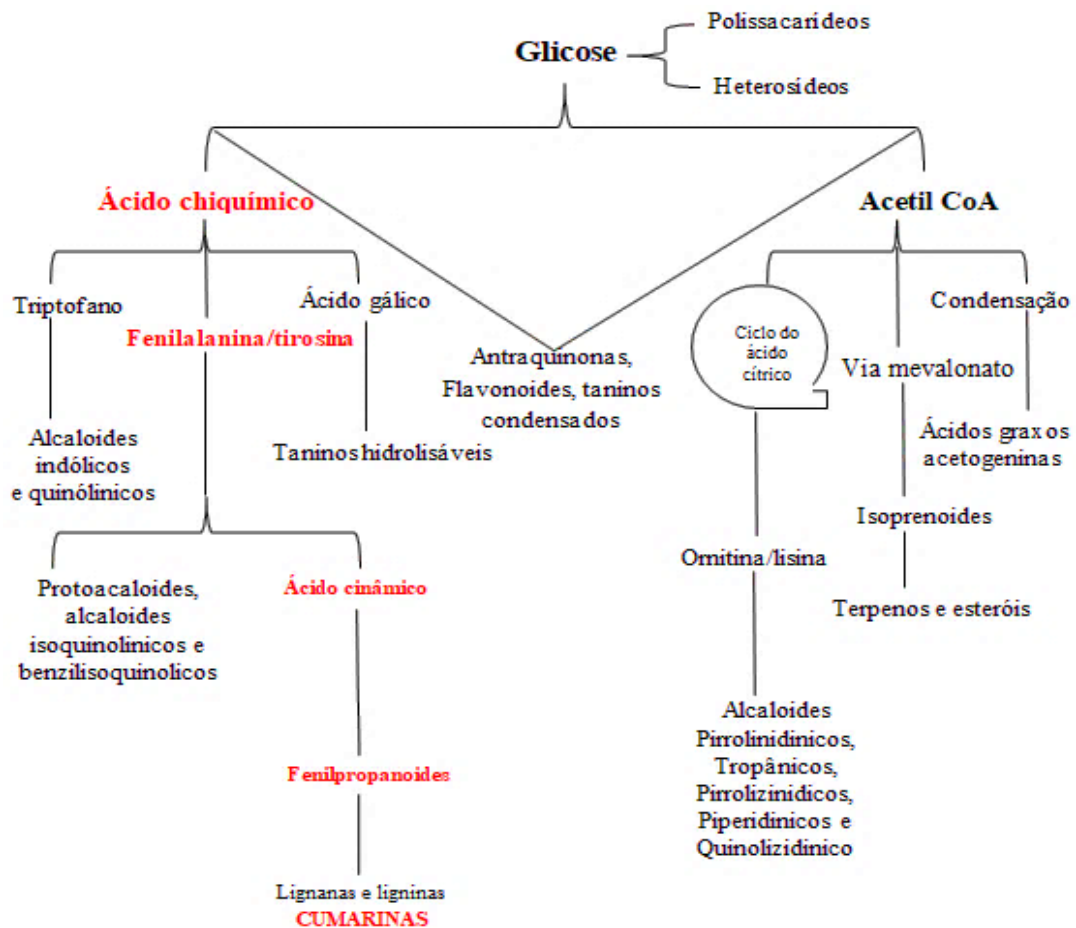
O metabolismo pode ser denominado como um conjunto de reações químicas em um organismo vivo. Por sua vez, o metabolismo abrange as reações de síntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) dos compostos químicos, bem como processos de transformações (SIMÕES et al., 2007). O produto do metabolismo são os metabólitos primários e metabólitos secundários (YANG et al., 2018).

Os metabólitos primários são essenciais a todos os seres vivos como os carboidratos simples, proteínas e lipídios, já os metabólitos secundários é a principal fonte dos alelopatinas, produzidos em pequenas quantidades, e, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal, muitas vezes conferem vantagens adaptativas. A síntese está relacionada a tipos celulares diferenciados e atrelada aos estádios de desenvolvimento específicos, tornando a identificação, isolamento e purificação mais laboriosos.

Os metabólitos secundários são extremamente heterogêneos. Uma classe química pode estar restrita a uma família, gênero ou espécie, em particular, essa diferenciação, pode ser utilizada como caractere taxonômico (COLOMBO et al., 2017).

Didaticamente, os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos, os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (FIGURA 1).

Figura 1- Rotas de síntese dos principais metabólitos secundários em plantas, destacando a cumarina.



Fonte: Adaptado da obra de Simões et al. (2007).

Muitos desses compostos são sintetizados e direcionados para a defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2017). Os compostos fenólicos são originados de duas rotas sintéticas distintas, o ácido chiquímico (a partir de carboidratos) e acetato-polimalato (Acetil-CoA). A origem dos terpenos pode ser pela rota do ácido mevalônico, presente no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, localizados nos cloroplastos. Os alcaloides possuem uma origem bastante diversa, entretanto, sempre a partir de aminoácidos aromáticos, por meio do triptofano e da tirosina, os quais são derivados do ácido chiquímico e dos aminoácidos alifáticos a partir do Acetil-CoA (ornitina e lisina) (FIGURA 1) (SIMÕES et al., 2007).

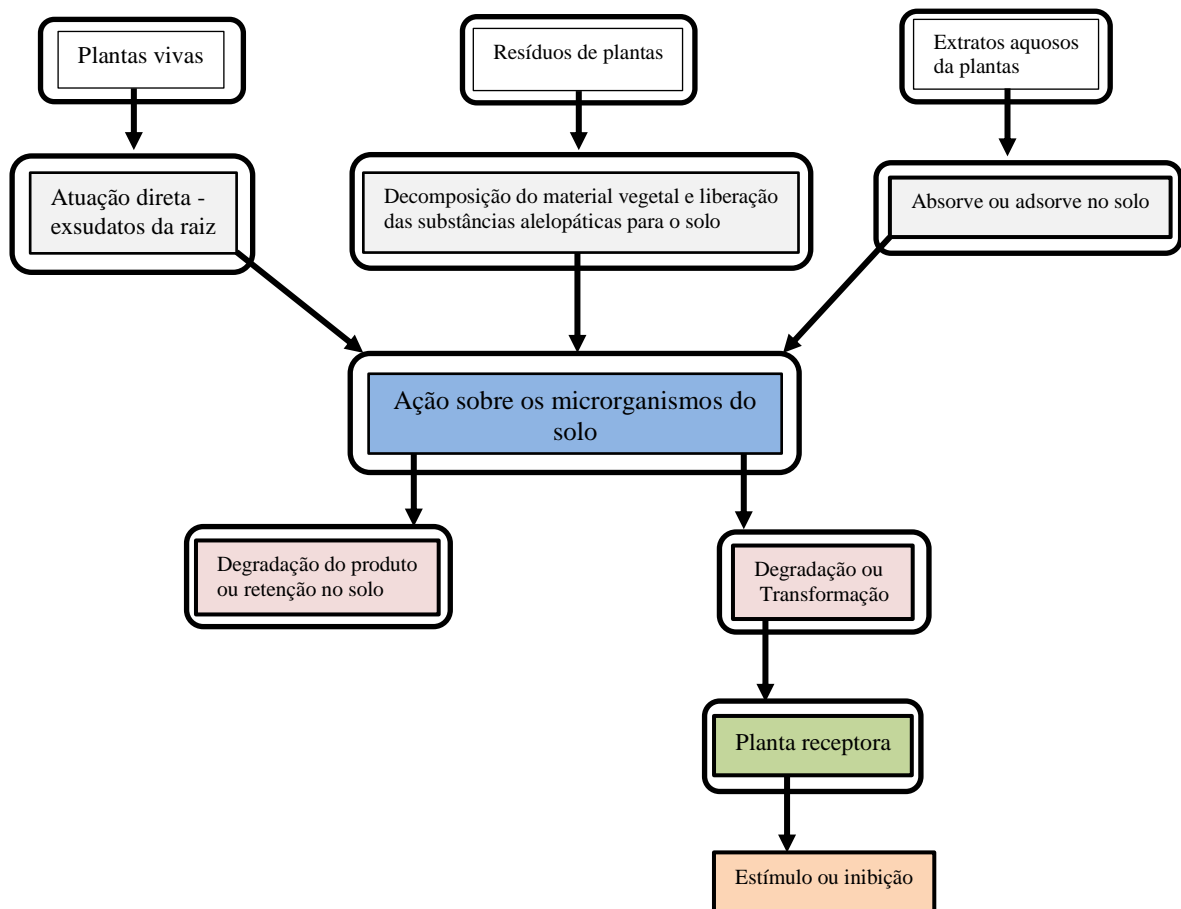
Em relação à síntese, os alelopatinos são produzidos em várias partes do vegetal, e muitas vezes armazenados em células específicas, a fim de evitar a autotoxicidade (GERSHENZON; CROTEAU, 1991). A síntese está relacionada também aos fatores abióticos (estresse), como luz (intensidade e qualidade), temperatura, radiação, ciclo circadiano, disponibilidade de água, nutrientes e textura do solo (EINHELLIG, 1996; GHORBANPOUR, 2016; HATAMI, KARIMAM; MOHAMMADKHANI; SERVATI, 2018).

A natureza química dos compostos alelopáticos presentes nas plantas determina a toxicidade, o modo de liberação adequado, a concentração bioativa, a persistência e distribuição no ambiente, principalmente em função do tipo de solo (INDERJIT; DUKE, 2003). De acordo com Duke (1985), o solo é o principal meio de transporte do aleloquímico de uma planta doadora para uma receptora, podendo determinar sua efetividade. Em solos arenosos, por exemplo, não existe retenção das moléculas nas partículas sólidas, se comparado aos solos argilosos, logo, os metabólitos ficam disponíveis na fase aquosa (INDERJIT; DAKSHINI, 1995).

Entretanto, para que os metabólitos secundários produzam uma resposta eficaz na planta adjacente é necessário que quantidades adequadas possam se acumular no ambiente por um determinado período de tempo (MAHDAVIKIA; MOHAMMD, 2016). Por exemplo, as raízes do sorgo produzem e liberam a quinina sorgoleona em concentrações aproximadas de 10-100 μM . Todavia, a concentração necessária para a sorgoleona desempenhar a atividade alelopática (inibir a germinação e o crescimento) é de apenas 10 μM (KATO-NOGUCHI, 2013).

Após a liberação no ambiente, os alelopatinos podem atuar de maneira direta e/ou indireta: na forma indireta (FIGURA 2), as substâncias interagem com as partículas do solo, ou ainda atuam sobre a microbiota associada às raízes das plantas (nitrosomonas e nitrobacter), alterando o processo de nitrificação (FERREIRA; AQUILA, 2000). Na forma direta, interagem com as enzimas da parede celular, alterando a permeabilidade seletiva das membranas biológicas, afetando a germinação, o desenvolvimento, a absorção de nutrientes e a síntese proteica (ASLAM et al., 2017).

Figura 2- Possíveis mecanismos de liberação e transformação de alelopatinos.



Fonte: adaptado de Aslam et al. (2017).

2.3 Mecanismos de ação dos alelopatinos e uso na agricultura

Os mecanismos de atuação dos alelopatinos, de maneira geral, não foram estabelecidos, embora alguns efeitos fisiológicos sejam conhecidos e associados à atuação de determinada molécula (EINHELLIG, 1995). Dentre as alterações provocadas, destacamos as respostas visíveis associadas à atividade alelopática, como a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento. Entretanto, as mudanças internas ocorridas a nível celular é que determinam os sintomas visíveis.

Espécies como aveia, sorgo e o pepino são ricas em ácido benzoico, que juntamente com os ácidos clorogênico, caféico e *p*-cumárico são amplamente distribuídos no reino vegetal e são inibidores de várias espécies. De acordo com Yu e Matsui (1997) afetam às relações hídricas e a absorção mineral (NO^{-3} , H_2PO^{-4} , SO_2^{-4} , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2}), o teor de clorofila, a fotossíntese e a atividade dos fitohormônios (RICE, 1984; JABRAN et al. 2012;

ASLAM et al., 2017). Por exemplo, o ácido caféico atua nas raízes de feijão, impedindo o enraizamento e induzindo o estresse oxidativo (BATISH et al., 2008). Aerts et al. (1991) descreveram a atividade dos alcaloides quinolínicos, indólicos e esteroidais com efeito fitotóxico sobre o metabolismo enzimático, alterações no DNA e na via glicolítica.

Outro exemplo são os compostos fenólicos liberados pelas raízes de plantas que podem suprimir a oxidação de NH_4^+ ao NO_3^- e inibir a atividade de bactérias nitrificantes (RICE, 1984). As cumarinas, um grupo de compostos fenólicos, (1,2- benzopirona e a escopolamina) impedem a distribuição polar da auxina e a fluorescência da clorofila *a* em *A. thaliana* (ARANITI et al.; 2017; GRAÑA et al.; 2017).

A maioria dos alelopatinos causam efeitos sistêmicos na planta receptora, principalmente devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs, pode ser originado a partir de uma molécula de oxigênio em seu estado diatômico (O_2), que ao aceitar um elétron forma o superóxido (O_2^-). Este processo ocorre nos tecidos vegetais, por diversos mecanismos, dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O_2 , formando superóxido. Por exemplo, o sorgoleone, isolado do *Sorghum bicolor*, pode bloquear o fluxo de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I (GONZALES et al., 1997), aumentando a produção de EROs que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares.

Os alelopatinos também podem formar radicais semioquímicos (derivado das quinonas) ou podem atuar sobre a NADPH oxidase, uma enzima que transfere elétrons do NADPH e doa para um aceptor (O_2) formando o superóxido (ALMEIDA et al., 2008). O alelopatino (N-fenil-2-naftilamina), isolado de macrófitas aquáticas desencadeia a produção de EROs para romper a estrutura subcelular da *Chlorella vulgaris*, evidenciado através do aumento da atividade das enzimas (SOD e CAT) (QIAN et al., 2009).

Os radicais superóxido podem sofrer uma série de transformações através de processos enzimáticos, tornando-se mais reativos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxil (OH^\cdot) ou hidroperóxil (HO_2^\cdot) (HAMMOND; JONES, 1996). Consequentemente, estes radicais podem afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares, causando danos ao DNA e às proteínas (ABBAS et al., 2018). Alguns alelopatinos podem causar despolarização das membranas celulares, aumentando sua permeabilidade e induzindo a peroxidação dos lipídios, causando um distúrbio celular generalizado que conduz à morte das células (YU et al., 2003).

A eliminação do radical superóxido (O_2^-) é realizada por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a peróxido dismutase (POD), que catalisa o O_2^- em H_2O_2 , protegendo às

células dos efeitos tóxicos desses radicais (DEL RIO et al., 2002). Entretanto, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados por outras enzimas, como a catalase (CAT) e a glutatona redutase (GSH), que atuam transformando as espécies reativas de oxigênio intermediárias em água, logo o aumento da atividade ou redução acentuada dessas enzimas sinalizam um aumento no estresse oxidativo das células.

2.4 Uso de plantas na obtenção de herbicidas

O uso de plantas no controle de pragas agrícolas remonta a dois mil anos atrás, em regiões como o antigo Egito, China, Grécia e Índia (THACKER, 2002). Na Europa e na América do Norte, o uso documentado é de 150 anos. Em meados da década de 1930 à 1950 descobriram-se as principais classes de fitossanitários sintéticos (por exemplo, organoclorados, organofosforados e piretroides), que causaram muitos problemas ambientais como envenenamento agudo e crônico de aplicadores, trabalhadores agrícolas e até consumidores; morte de peixes, pássaros e outros animais selvagens; interrupção do controle biológico natural e polinização; contaminação extensiva das águas subterrâneas; e a progressão da resistência aos herbicidas em populações (SOUSA et al., 2016; BERTRAND et al., 2017; CHIARELLO et al., 2017; MUENZE et al., 2017).

A indústria, geralmente, utiliza as plantas para realizar a prospecção de novas substâncias ativas, ou como arcabouço molecular, com vistas a melhorar a ação ou para tornar viável a produção em larga escala. Por exemplo, temos a produção do análogo como a mesotriona, que inibe a biossíntese de carotenoides nos cloroplastos (OWENS; NANAYAKKARA; DAYAN, 2013), é sintetizada a partir da leptospermone. Essa molécula possui atividade alelopática e é encontrada em plantas do gênero *Calistemon* spp. Naturalmente a leptospermone causa albinismo em algumas espécies de plantas daninhas.

O Bazanin® e o Quinclorac®, ambos da BASF/Alemanha, são exemplos de herbicidas comerciais elaborados com base em compostos secundários de plantas, o primeiro a partir de benzoxazinonas extraídas de gramíneas e o segundo elaborado a partir do ácido quinolínico obtido de *Nicotina tabacum*. Outro exemplo, o Cinmethylin® foi desenvolvido nos EUA pela Shell a partir do composto natural 1,8-cineol obtido de várias plantas (GROSSMANN et al., 2012).

2.5 *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e a síntese de cumarina

A família Asteraceae é um grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, com 1.100 gêneros e 25.000 espécies, aproximadamente. Cerca de 98 por

cento dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats. Plantas dessa família são amplamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, herbicidas, dentre outros (VERDI et al., 2005).

Dentre inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas pela população está a *Mikania laevigata* encontrada, principalmente, nas regiões Sul e Sudeste do país. Comumente conhecida como "guaco", tem habito trepador, com haste cilíndrica ramificada e folhas carnosas (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010). As flores são esbranquiçadas, dispostas em inflorescência panícula, com até 30 cm de comprimento, onde os capítulos se encontram reunidos em glomérulos.

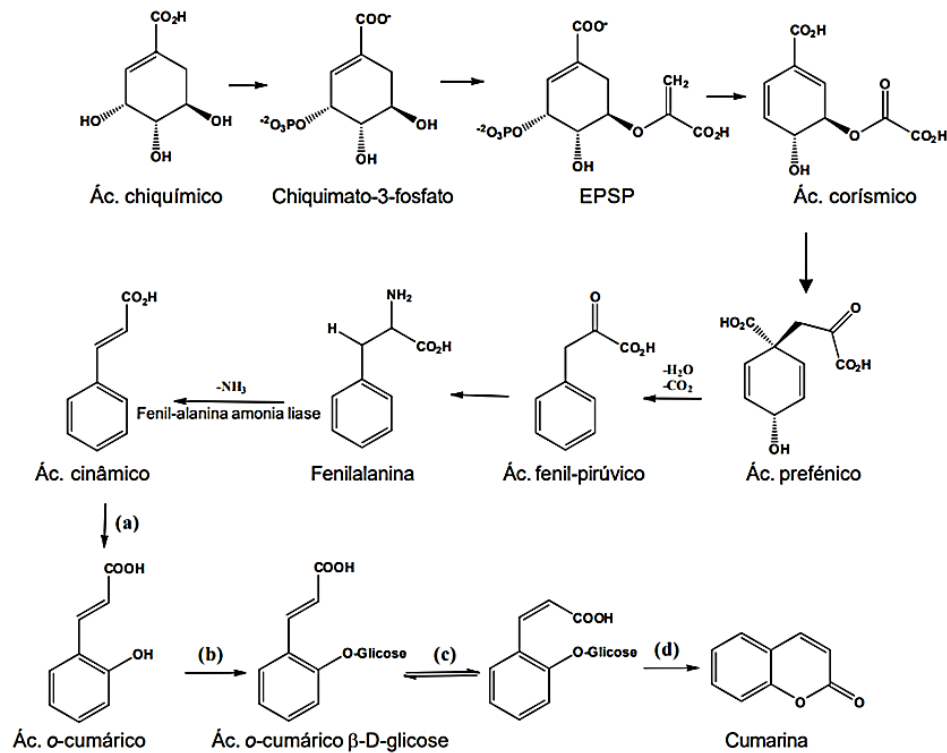
A espécie *Mikania laevigata* (guaco) cresce espontaneamente em matas primárias, capoeira, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, várzeas sujeitas a inundações e possui boa adaptação ao cultivo doméstico. A planta é bastante procurada por abelhas melíferas durante a época da floração. Reproduz-se por sementes ou plantio de estacas do caule, preferencialmente em terrenos arenosos e úmidos (RITTER; MIOTTO, 1992).

Quanto à composição química das folhas, estão presentes, cumarina, triterpenos/esteroides e heterosídeos flavônicos (BOLINA et al., 2009). São encontrados ainda, óleos essenciais, constituídos por sesquiterpenos ricos em germacreno-D (SANTOS et al., 2017).

A cumarina [1,2- benzopirona] é a principal responsável pelas atividades biológicas da *M. laevigata*, tais como antimicrobianos, antivirais, anti-inflamatória, anticoagulante, broncodilatadora e antioxidante (CZELUSNIAK et al.; 2012) e alelopática (FELIX et al., 2007; RAZAVI, 2011).

As cumarinas são derivadas da via do ácido chiquímico (FIGURA 3), o qual é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A junção do ácido chiquímico com uma molécula de fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico. A partir deste, ocorre à formação de aminoácidos aromáticos, tais como o triptofano, fenilalanina e a tirosina. A fenilalanina sofre ação da fenilalanina-amônio-liase (PAL), dando origem ao ácido cinâmico, que por sua vez origina o ácido *o*-cumárico. O ácido *o*-cumárico sofre uma glicosilação e isomerização cis/trans, e posteriormente uma lactonização, formando a cumarina. A cumarina é liberada dos tecidos vegetais após hidrólise enzimática, processo que ocorre após a danificação dos tecidos vegetais durante a extração e/ou processamento (*a* - trans -cinamto-4-hidroxilase; *b* - hidroxilação; *c* - gicolisalação; *d* - lactonização) (CZELUSNIAK et al., 2012).

Figura 3-Rota biossintética da cumarina



Fonte: CZELUSNIAK et al. (2012).

A cumarina é amplamente conhecida pela capacidade de inibir a germinação (WU et al., 2016), possuir efeitos sinérgicos com promotores e inibidores de crescimento (SALEH; EL-SOUD, 2015). Perez e Moraes (1990) constataram a redução da porcentagem e velocidade de germinação em *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. quando utilizado 10,0 mM de cumarina. O efeito observado na redução da germinação ou na velocidade de germinação é o reflexo da desorganização ao nível celular, atrelado principalmente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), originando o estresse oxidativo. Mahmood et al. (2013), constataram que cultivares de arroz quando expostas a 400 mM de cumarina aumentaram a atividade das enzimas antioxidativas como a superóxido dismutase (SOD - 23%), catalase (CAT - 16%) e (POD - 17%), seguido de aumento os nos teores de MDA de 8 a 10%, indicando a total desorganização das membranas celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, G.; MURTAZA, B.; BIBI, I.; SHAHID, M.; NIAZI, M.N.K.; KHAN, M.I.; AMJAD, M.; HUSSAIN, M.; NATASHA. Arsenic Uptake, Toxicity, Detoxification, and Speciation in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 59, 2018.
- ABENAVOLI, M.R.; SORGONA, A.; SIDARI, M.; BADIANI, M.; FUGGI, A. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. *Journal of plant physiology*, v. 160, n. 3, p. 227-237, 2003.
- AERTS, R.J.; SNOEIJER, W.; VAN DER MEIJDEN, E.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by Cinchona alkaloids? *Phytochemistry*, v. 30, n. 9, p. 2947-2951, 1991.
- ALMEIDA, G.D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M.C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse Oxidativo em Células Vegetais Mediante Aleloquímicos. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ARANITI, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; CHAMBERY, A.; RUSSO, R.; ESPOSITO, A.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated -omic approach. *Journal of Plant Physiology*, v. 213, p. 30-41, p. 2017.
- ASLAM, F.; KHALIQ, A.; MATLOOB, A.; TANVEER, A.; HUSSAIN, S.; ZAHIR, Z.A. Allelopathy in agro-ecosystems: a critical review of wheat allelopathy-concepts and implications. *Chemoecology*, v. 27, p. 1-24, 2017.
- BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KAUR, S.; KOHLI, R.K.; YADAV, S.S. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology*, v. 165, n. 3, p. 297-305, 2008.
- BERTRAND, L.; MARINO, D.J.; MONFERRAN, M.V.; AME, M.V. Can a low concentration of an organophosphate insecticide cause negative effects on an aquatic macrophyte? Exposure of *Potamogeton pusillus* at environmentally relevant chlorpyrifos concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, v. 138, p. 139-147, 2017.
- BOLINA, R.C.; GARCIA, E.F.; DUARTE, M.G.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009.
- CANDOLLE, A.P. *Physiologie Vegetale, ou exposition des forces et des fonctions vitales des vegetaux*. **Bechet Jeune**, 1832.
- CHENG, F.E.; CHENG, Z. Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Front Plant Sci.*, v. 17, n. 6, p. 1020, 2015.
- CHIARELLO, M.; GRAEFF, R.N.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHNEIDER, V.E.; MOURA, S. Determination of Pesticides in Water and Sediment by HPLC-HRMS and its Relationship With the use and Land Occupation. *Química Nova*, v. 40, n. 2, p. 158-165, 2017.

COLOMBO, P.S.; FLAMINI, G.; RODONDI, G.; GIULIANI, C.; SANTAGOSTINI, L.; FICO, G. *Primula* species of European. *Phytochemistry*, v. 143, p. 132-144, 2017.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **J. Exp. Bot.**, v. 1, p. 1255-1272, 2002.

DIAS, L.S. ; DIAS, A.S. (2007) Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. **Chemical Ecology Unit**, Centro de Ecologia e Ambiente, Universidade de Évora, v. 94, p. 7002-554.

DUKE, S.O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. Pp. 91-112. In: S.O. Duke (ed.) **Weed Physiology**. Vol. II. Boca Raton, CRC Press, 1985.

EINHELLING, F.A. Interaction involving allelopathy in cropping systems. **Agron. J.**, v. 88, p. 886-893, 1996.

EL-WAKEIL, N.E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. Review. **Gesunde Pflanzen.**, v. 65, p. 125-149, 2013.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; PEREZ, N.B. AUTOTOXICITY IN TOUGH LOVEGRASS (*Eragrostis plana*). *Planta daninha.*, v. 35, n. 7, p. 1-7, 2017.

FELIX, R. A. Z.; ORIKA, E. O.; SILVA, C. P.; RODRIGUES, J. D.; PIERI, C. Efeitos Alelopáticos da *Amburana cearensis* L. (Fr.All.) AC Smith na Germinação de Sementes de Alface (*Lactuca sativa* L.) e de Rabanete (*Raphanus sativus* L.). **Rev. Bras. Bioc.**, v. 5, p. 138-140, 2007.

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

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre. **Artmed**, 2004. 520p.

GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Terpenoids In: ROSENTHAL, G.A.; BERENBAUM, M.R. Eds. Herbivores their interactions with Secondary Metabolites. **New York: Academic Press**. 1991. Pp. 165-219.

GONZALES, V.M.; KAZIMIR, J.; NIMBAL, C.I.; WESTON, L.A. CHEINAE, G.M. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural Food Chemical**, v. 45, p. 1415-1455, 1997.

GOPLIN, J.J.; COULTER, J.A.; SHEAFFER, C.C.; BECKER, R. L.; BREITENBACH, F. R.; BEHNKEN, L.M.; GUNSOLUS, J.L. Economic Performance of Crop Rotations in the Presence of Herbicide-Resistant Giant Ragweed. *Agronomy Journal*, v. 110, n. 1, p. 260-268, 2018.

GRAÑA, E.; COSTAS-GILA, A.; LONGUEIRA, S.; CELEIROB, M.; TEIJEIRAB, M.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRA, A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on Arabidopsis cell structure and morphology. **Journal of Plant Physiology**. v.218, p.45–55, 2017.

GROSSMANN, K.; HUTZLER, J.; TRESCH, S.; CHRISTIANSEN, N.; LOOSER, R.; EHRHARDT, T. On the mode of action of the herbicides cinmethylin and 5-benzyloxymethyl-1, 2-isoxazolines: putative inhibitors of plant tyrosine aminotransferase. **Pest Management Science**, v. 68, n. 3, p. 482-492, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K.E; JONES, J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HATAMI, M.; KARIMAN, K.; GHORBANPOUR, M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of The Total Environment*, v. 571, p. 275-291, 2016.

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. 2017. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em 24 Janeiro de 2018.

HISTER, C.A.L.; TRAPP, K.C.; TEDESCO, S.B. Potencial alelopático e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine sobre *Lactuca sativa* L. *Rev. Bras. Bioci.*, v. 14, n. 2, p. 124-129, 2016.

HOFMANN, N.R. Epigenetic Battles Underfoot: Allelopathy among Plants Can Target Chromatin Modification. **Plant Cell**, v. 27, n. 11, 2015.

INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **Bot. Ver.**, v. 61, p. 28-44, 1995.

INDERJIT; DUKE, S. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.

JABRAN, K.; MAHAJAN, G.; SARDANA, V.; CHAUHAN, B. S. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, v. 72, p. 57-65, 2015.

KATO-NOGUCHI, H.; PETERS, R.J.J. The Role of Momilactones in Rice Allelopathy. *Chem Ecol.*, v. 39, n. 175, 2013.

KUPIDLOWSKA, E.; DOBRZYNSKA, K.; PARYS, E.; ZOBEL, A.M. Effect of coumarin and xanthoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake, and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. *Journal of Chemical Ecology*, v. 20, p. 2471– 2480, 1994.

LUPINI, A.; SORGONÀ, A.; PRINCI, M.P.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M. R. Morphological and physiological effects of *trans*-cinnamic acid and its hydroxylated derivatives on maize root types. **Plant Growth Regul.**, v. 78, n. 263, 2016.

MAHDAVIKIA, F.; MOHAMMAD, J.S. Secondary metabolites of peppermint change the morphophysiological and biochemical characteristics of tomato. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 127-133, 2016.

- MAHMOOD, K.; KHAN, M. B.; SONG, Y.Y.; YE, M.; BAERSON, S.R.; ZENG, R.S. Differential morphological, cytological and biochemical responses of two rice cultivars to coumarin **Allelopathy Journal**, v. 31, p. 281-296, 2013.
- MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agron J.**, v. 88, p. 854-9, 1996.
- MOHAMMADKHANI, N.; SERVATI, M. Nutrient concentration in wheat and soil under allelopathy treatments. **Journal of Plant Research**, v. 131, n. 1, p. 143–155, 2018.
- MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. Allelopathie. Verlag, **Jena: Gustav Fischer**, 1937. p.106.
- MUNZE, R.; HANNEMANN, C. ; ORLINSKIY, P.; GUNOLD, R.; PASCHKE, A.; FOIT, K.; BECKER, J.; KASKE, O.; PAULSSON, E.; PETERSON, M.; JERNSTEDT, H.; KREUGER, J.; SCHUURMANN, G.; LIESS, M. Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. **Science of the Total Environment**, v. 599, p. 387-399, 2017.
- NAPIMOGA, M.H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 809–820, 2010.
- OWENS, D.K.; NANAYAKKARA, N.P.D.; DAYAN, F.E. In planta Mechanism of Action of Leptospermone: Impact of Its Physico-Chemical Properties on Uptake, Translocation, and Metabolism. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 262-270, 2013.
- PEREZ, S. C. J. G. A.; MORAES, J. A. P. V. Influência da temperatura, da interação temperatura-giberelina e do estresse térmico na germinação de algarobeira. **Rev. Bras. Fis.**, v. 2, 1990.
- PUTNAM, A.R.; DUKE, W.B. Allelopathy in agrossystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 43-451, 1978.
- QIAN, H.; XU, X.; CHEN, W.; JIANG, H.; JIN, X.; LIU, W.; FU, Z. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 75, p. 368–375, 2009.
- RAZAVI, S. M. Plant coumarins as allelopathics agents. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, p. 86-90, 2011.
- RICE, E.L. Allelopathy. **Academic Press**, New York, 2 ed, 1984.
- RITTER, M.R.; MIOTTO, S.T.S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **HOEHNEA - Periódico Científico do Instituto de Botânica**, v. 32, p. 309-59, 2005.
- SALEH A.M.; EL-SOUD W.A. Evidence for “gibberellin-like” activity of coumarin. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 51-57, 2015.
- SANTOS, L. M. L, GERMANO, C. M., GONÇALVES, A. H.; BERTOLUCCI, S. K. V. Fitotoxicidade do Óleo Essencial de *Mikania laevigata* sobre o Desenvolvimento Inicial de

Duas Espécies Invasoras. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 8, n. 4, 2017.

SCHREINER, O.; SULLIVAN, M. X. Soil fatigue caused by organic compounds. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 39-50, 1909.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G.E.; SOARES, G.L.G. Something old, something new in allelopathy review: what grassland ecosystems tell us. **Chemoecology**, v. 27, p. 217–231, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: **Editora da UFSC**. 2007. Pp.1102.

SOUSA, A.S.; DUAVI, W.C.; CAVALCANTE, R.M.; MILHOME, M.A.L.; DO NASCIMENTO, R.F. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceara, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 90-95, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal - 6. ed. – Porto Alegre: Artmed. 2017.

TRACKER, J. M. R. An introduction to arthropod pest control. Cambridge University **Press Cambridge**. 2002.

TRAVLOS, I.; ROUSSIS, I.; RODITIS, C.; SEMINI, C.; ROUVALI, L.; STASINOPOULOU, P.; CHEIMONA, N.; VLASSOPOULOU, C.; BILALIS, D. Allelopathic Potential of Velvet Bean and Chia against Rigid Ryegrass. *Not. Bot. Horti. Agrobi.*, v. 46, n. 1, p. 173-176, 2018.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, v. 58, p. 1631–1646, 2002.

WHITTAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochemicals: chemical interaction between species. **Science**, v 171, p. 757-770, 1971.

WU, C.X.; ZHAO, G.Q.; LIU, D.L.; LIU, S.J.; GUN, X.X.; TANG, Q. Discovery and Weed Inhibition Effects of Coumarin as the Predominant Allelochemical of Yellow Sweetclover (*Melilotus officinalis*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 1, p. 168-175, 2016.

YANG, X.; FENG, L.; ZHAO, L.; LIU, X.S.; HASSANI, D.; HUANG, D.F. Effect of glycine nitrogen on lettuce growth under soilless culture: a metabolomics approach to identify the main changes occurred in plant primary and secondary metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 2, p. 467-477. 2018.

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

ZANUNCIO, J.C.; LACERDA, M.C.; ALCANTARA-DE LA CRUZ, R.; BRUGGER, B.P.; PEREIRA, A.I.A.; WILCKEN, C.F.; SERRAO, J.E.; SEDIYAMA, C.S. Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 245-250, 2018.

ZHANG, S.Z. Interference of allelopathic wheat with different weeds. *Pest Management Science*, v.72, n. 1, p. 172-178, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS*

*Elaborados de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003a)

ARTIGO 1- FITOTOXICIDADE *in vitro* DOS EXTRATOS DA *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker SOBRE *Lactuca sativa* L. E *Bidens pilosa* L

RESUMO - O método mais utilizado no Brasil para combater as plantas invasoras de áreas cultivadas são os herbicidas sintéticos, todavia o uso inadequado contamina o ambiente e os seres vivos. Os extratos vegetais são ricos em metabolitos secundários (alelopatinos) que podem atuar como herbicidas eficazes com menores riscos ao ambiente. Objetivou-se avaliar a fitotoxicidade dos extratos aquosos e etanólicos de *M. laevigata* sobre o crescimento e a indução do estresse oxidativo de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa*. Para isso, foram avaliados a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento inicial, e os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do malonaldeído (MDA) das espécies *L. sativa* e *B. pilosa*. Foram testadas cinco concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) dos extratos (aquoso e etanólico) e água destilada como controle. Na presença do extrato etanólico as espécies (*L. sativa* e a *B. pilosa*) reduziram 85 e 90% da germinação, respectivamente. Quanto ao comprimento da radícula, na menor concentração dos extratos (0,1 mg mL⁻¹) o desenvolvimento não foi afetado e na maior concentração (2,0 mg mL⁻¹) as reduções foram de ~ 85% para *L. sativa* e 65% para *B. pilosa*. O aumento do teor de H_2O_2 foi dose dependente em relação a concentração dos extratos, seguida do aumento dos valores de MDA para *L. sativa* e *B. pilosa*. Todas as plântulas cultivadas na concentração de 3 mg mL⁻¹ do extrato etanólico sofreram necrose, impossibilitando as análises subsequentes. Conclui-se que o extrato etanólico de *M. laevigata* na concentração 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹ demonstraram fitotoxicidade com aumento do estresse oxidativo nas espécies *L. sativa* e *B. pilosa*.

Palavras-chave: Alelopatinos. Guaco. Cumarina. Inibição.

ABSTRACT - The most widely used method in Brazil to combat invasive plants in cultivated areas the application in of synthetic herbicides. However, the inappropriate use can contaminates the environment and living things. Plant extracts are rich in secondary metabolites (allelopathins) that can act as effective herbicides with lower environmental risks. The objective of this study was to evaluate the phytotoxicity of the aqueous and ethanolic extracts of *M. laevigata* on the growth and induction of oxidative stress of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. For this, germination percentage, germination rate index, initial growth, hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA) levels of *L. sativa* and *B. pilosa* were evaluated. Five concentrations (0.1, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg mL⁻¹) of the extracts (aqueous and ethanolic) were tested and distilled water was used as control. In the presence of the ethanolic extract the tested species (*L. sativa* and *B. pilosa*) reduced 85 and 90 % of the germination, respectively. As regards the length of the radicle, in the lowest concentration of the extracts (0.1 mg mL⁻¹) the development was not affected and in the highest concentration (2.0 mg mL⁻¹) the reductions were ~ 85% for *L. sativa* and 65 % for *B. pilosa*. The increase in H_2O_2 content was dose-dependent in relation to extracts concentration, followed by increased MDA values for *L. sativa* and *B. pilosa*. All the seedlings cultivated at the concentration of 3 mg mL⁻¹ of the ethanolic extract suffered necrosis, making the subsequent analyzes impossible. The ethanolic extract of *M. laevigata* at concentrations 2.0 and 3.0 mg mL⁻¹ showed phytotoxicity with increased oxidative stress in *L. sativa* and *B. pilosa* species.

Keywords: Allelopathies. Guaco. Coumarin. Inhibition.

1 INTRODUÇÃO

Plantas invasoras de áreas cultivadas podem interferir negativamente na produção dos agroecossistemas. Geralmente, o sucesso das plantas invasoras está associado à elevada capacidade competitiva, na captação de água, luz e nutrientes (SCHAFFNER; BOSSDORF, 2013; JABRAN et al., 2015; PAREPA).

Um dos métodos mais utilizados para combater este problema é o uso de agroquímicos sintéticos, que usualmente são prejudiciais ao ambiente, devido à contaminação do lençol freático e do solo (ISMAIL et al., 2016). Em relação ao consumo, o Brasil é o maior do mundo, utilizando 352,3 mil toneladas por safra (CASSAL, 2014; MAPA, 2015). Ademais, são encontrados vários casos de plantas invasoras resistentes aos herbicidas comerciais (SILVA et al., 2013).

Estes fatores têm indicado que novos modelos de controle de plantas invasoras precisam ser estabelecidos, que sejam ao mesmo tempo eficientes no controle dessas plantas, preservem os interesses da sociedade e não contaminem os recursos naturais (SOUZA FILHO; RODRIGUES, 2005). Diante disso, os compostos vegetais que possuem propriedades alelopáticas tem despertado interesse na comunidade científica (HISTER; TRAPP; TEDESCO, 2016; ZHANG et al. L., 2016), uma vez que podem ser utilizadas como fonte de herbicidas naturais que agem diretamente sobre as plantas invasoras e possuem baixo impacto ambiental (QUAYYUM et al., 2000; HAIG et al., 2009). A vantagem na utilização dos extratos vegetais em relação às moléculas isoladas está no baixo custo e facilidade da obtenção da matéria prima.

Os extratos da *Mikania laevigata* ou “guaco” são ricos em cumarina [1,2-benzopirona], a qual é considerada o marcador químico da espécie (ANVISA, 2008). Em relação à atividade alelopática, a 1,2-benzopirona, pode promover ou inibir o crescimento das plantas, pois interferem na divisão, no alongamento e na diferenciação celular da raiz, sendo à resposta específica e dependente da concentração (ZOBEL; BROWN, 1995; ABENAVOLI et al., 2003; 2006).

Apesar da presença da cumarina nos extratos vegetais da *M. laevigata* e da atividade alelopática comprovada do extrato etanólico (BARATTO et al., 2008), não é sabido os mecanismos de ação do extrato sob o as plantas receptoras, podendo atuar na indução de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Nesse contexto, diante da potencial atividade da *M. laevigata* como bioherbicida, objetivou-se avaliar a fitotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso e etanólico das folhas da *M. laevigata* sobre o crescimento e o estresse oxidativo de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

Folhas de *M. laevigata* foram coletadas de plantas matrizes cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras-MG, do Departamento de Agricultura. O material herborizado foi identificado e incorporado ao acervo do herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), sob o número de registro PAMG 57818.

2.2 Obtenção dos extratos

As folhas da *M. laevigata* foram desidratadas a 40 °C, por 72h e trituradas em moinho de facas. Os extratos a 10% (p/v). Pesou-se 30,0 g de folhas pulverizadas de *M. laevigata* que foram submetidas à extração com etanol absoluto ou água ultrapura. Os extratos foram obtidos à temperatura ambiente, empregando-se 3 ciclos de sonicação de 20 min, usando-se 150 mL do solvente em cada ciclo. Os extratos foram filtrados em papel de filtro sob vácuo, reunidos em balão de evaporador rotatório, sendo concentrados até resíduo, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 40 °C. O perfil cromatográfico dos extratos foi determinado por CLAE-DAD. Os solventes de eluição foram de acordo com o método linear (fase A - ácido acético: água – 98:2%; fase B – metanol: água: ácido acético – 70:28:2%). Com fluxo de 1,00 mL/min; volume de injeção de 20 µL; tempo de corrida de 60 min.; temperatura de 35°C; detecção em 280 nm. Detector com arranjo de diodo (DAD) com modelo SPD-M20A e o forno CTO-20AC UFLC Shimadzu.

Para os ensaios biológicos, os extratos brutos foram ressuspensos nos seus respectivos líquidos extratores nas concentrações de 0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹. O pH e o potencial osmótico foram determinados para as soluções de trabalho e os resultados encontram-se na Tabela 1. As medidas de pH foram aferidas em pHmetro (PG1800, Gehaka) e o potencial osmótico, pelo método de Chardakov (SALISBURY; ROSS, 1992).

Tabela 1-Valores de pH e potencial osmótico das soluções de trabalho de *Mikania laevigata*.

Extratos	Concentrações (mg mL ⁻¹)	pH	PO (-MPa)
Controle	Água	6,8	0,000

Aquoso	0,1	6,46	0,022
	1,0	6,68	0,044
	1,5	6,51	0,067
	2,0	6,56	0,089
	3,0	5,72	0,100
Etanólico	0,1	6,93	0,026
	1,0	6,75	0,030
	1,5	6,23	0,054
	2,0	6,72	0,080
	3,0	6,5	0,107

2.3 Teste de germinação das sementes da *L. sativa* e *B. pilosa*

As sementes de *L. sativa* foram empregadas devido à rápida germinação, crescimento linear e à sensibilidade na presença dos aleloquímicos (FORMAGIO et al., 2014). Enquanto, a espécie invasora *B. pilosa* foi utilizada devido a ampla disseminação e dificuldade do controle em diversas culturas agrícolas (SANTOS; CURY, 2011).

Placas de Petri (9,0 cm Ø) autoclavadas a 120 °C por 30 min, contendo papel filtro, receberam 5,0 mL de cada solução de trabalho (TABELA 1). As placas contendo os papéis de filtro, umedecidos com soluções etanólicas, foram secas em câmara de fluxo laminar durante 12h. Em seguida, acrescentaram-se 5 mL de água destilada, tamparam-se e envolveram nas com filme plástico, mantendo-as em câmara de germinação do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h e temperatura a 24 °C para a espécie *L. sativa* e 8h e 25°C para *B. pilosa*. Como controle foi utilizado água destilada (ASLANI et al., 2014).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 e a testemunha adicional, com quatro repetições de 50 aquênios da *L. sativa* L. (cv. Grands rapids) e cinco repetições de 25 sementes da *B. pilosa*. A germinação foi avaliada diariamente durante sete dias para obtenção do índice de velocidade germinação (IVG), conforme Maguire (1962); e a porcentagem germinação de acordo com Benincasa (1988). As plântulas foram consideradas germinadas quando apresentaram 2 mm de protrusão da radícula e foram classificadas como normais ou anormais, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para determinar o IC₅₀ (mg mL⁻¹), ou seja, as concentrações dos extratos capaz de inibir 50% da germinação total das sementes, utilizou-se o programa GraphPad 7.3.

2.4 Bioensaio de crescimento das plântulas de *L. sativa* e *B. pilosa*

As sementes da *L. sativa* e *B. pilosa* foram pré-germinadas em água destilada por 48h e 72h, respectivamente. Logo após este período, 40 plântulas (quatro repetições de 10), foram transferidas para as caixas gerbox (11x11x3,5cm) contendo 6 mL das soluções referentes aos tratamentos (Tabela 1). Àquelas contendo soluções etanólicas foram levadas ao fluxo laminar por 12h para evaporação do solvente. Como controle foi utilizado água destilada. Em seguida, as caixas foram vedadas e incubadas em B.O.D a 24 °C para *L. sativa* e 25 °C para *B. pilosa* com fotoperíodo de 8h, por 10 dias. Decorrido este período, foram mensurados o eixo hipocótilo-radícula (mm), área foliar (comprimento x largura) (mm²) e matéria seca (g) das plântulas de cada tratamento.

2.5 Determinação do teor de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica

Para avaliação do estresse oxidativo, 0,2 g de matéria fresca das plântulas de *L. sativa* e *B. pilosa* foram maceradas em nitrogênio líquido, e o material resultante foi homogeneizado com alíquotas de PVPP em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (p/v) e centrifugados, a 13.000 g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar o conteúdo de H₂O₂ e malondialdeído (MDA). Os teores de H₂O₂ foram mensurados de acordo com Velikova et al. (2000). Adicionou-se 45 µL de extrato ao meio de reação constituído por 45 µL de tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ (pH 7) e 90 µL de iodeto de potássio 1,0 mol L⁻¹. A absorbância das soluções foi mensurada a 390 nm. A curva de calibração foi construída a partir de soluções de H₂O₂ de 0, 5, 15, 25, 35, e 45 µM. A equação da reta ($y = 0,014 x + 0,0069$ R² = 0,9831), em que y é a absorbância e x é a concentração, foi empregada para determinação dos teores de H₂O₂. Os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂ g⁻¹ de matéria fresca das plântulas.

A peroxidação lipídica foi verificada de maneira indireta pelo acúmulo do malonaldeído (MDA) e determinada de acordo com Cakmak e Horst (1991). A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C, por 30 min, e resfriado com banho de gelo. Os resultados foram expressos em nmol de MDA mg⁻¹ de matéria fresca das plântulas. Os teores de MDA foram estimados através do coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) através da equação $(A_{532} - A_{660})/\epsilon$. Os dados representam a média de três repetições de cada extrato nas concentrações utilizadas dosadas em duplicata.

2.6 Análise estatística

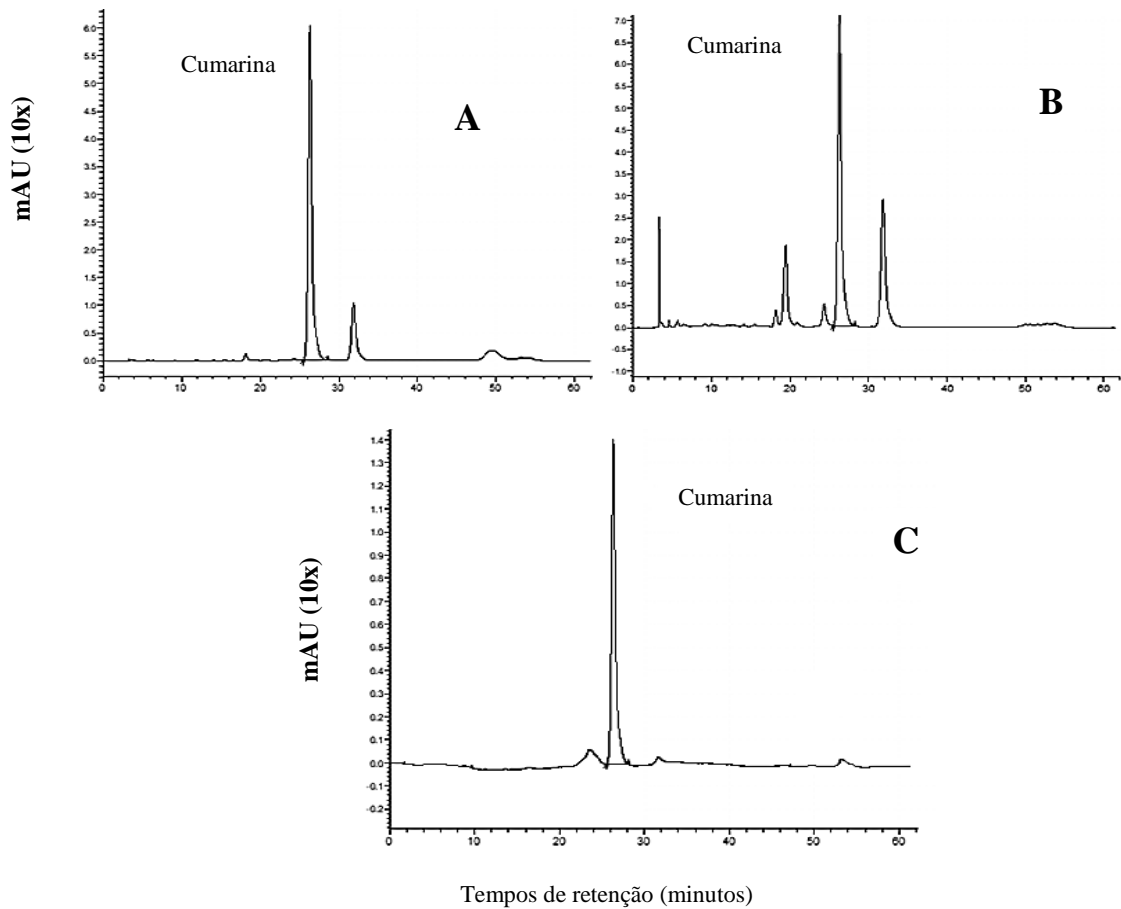
O IVG e a porcentagem de germinação foram transformados utilizando-se a metodologia Box-Cox (BOX; COX, 1964), para estabilizar ou reduzir a variabilidade existente e normalizar os resíduos. Para valores nulos, a família de transformações de Box-Cox fica restrita, então foi utilizada a variável somada a uma constante. Adotou-se o procedimento proposto por Yamamura (1999), com o parâmetro $c=0,5$.

Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o aplicativo computacional Assistat (SILVA, 2009).

3 RESULTADOS

As análises dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, contidos na Figura 1A e 1B, permite observar a presença da cumarina [1,2-benzopirona] nos extratos etanólico e aquoso da *M. laevigata*, baseado na similaridade do tempo de retenção com o padrão (FIGURA 1C e TABELA 2).

Figura 1-Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos da *M. laevigata*. Extrato etanólico (A); Extrato aquoso (B); Padrão da cumarina 1,2-benzopirona (C) (concentração 4×10^{-5} mol/L⁻¹). Detecção em 280nm.



Fonte: Do autor (2018).

Tabela 2-Tempos de retenção e áreas do maior pico em cada extrato e do padrão da cumarina [1,2-benzopirona].

Extratos	Tempo de retenção	Área do pico
Etanólico	26,299	204432045,9
Aquoso	26,360	23822510,1
Padrão (cumarina)	26,344	472,988

A germinação das sementes de *L. sativa* (TABELA 3), submetidas ao extrato etanólico, foi afetada significativamente nas concentrações 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹, e nas menores concentrações dos extratos aquosos e etanólicos os valores não diferiram do controle. O índice de velocidade de germinação (IVG) apenas na maior concentração do extrato etanólico (3,0 mg mL⁻¹) foi afetado negativamente, com redução de 94% em relação aos

valores observados no controle. Para as sementes de *B. pilosa* os extratos nas suas respectivas diluições (0,1; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL⁻¹) estimularam a germinação e o IVG, somente na maior concentração utilizada (3,0 mg mL⁻¹) foram observadas reduções, se comparado aos valores do controle (TABELA 3).

A concentração do extrato aquoso capaz de inibir 50% (IC₅₀) da germinação da *B. pilosa* foi de 1,17 mg mL⁻¹, enquanto que para *L. sativa* foi de 3,84 mg mL⁻¹. A solução etanólica para *L. sativa* foi de 0,79 mg mL⁻¹ e para *B. pilosa* 1,14 mg mL⁻¹ (TABELA 3).

Tabela 3- Porcentagem de germinação [G (%)] e valores de IC₅₀, índice de velocidade de germinação (IVG) de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* expostas a diferentes concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.

Soluções de trabalho	Concentração (mg mL ⁻¹)						IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
	0	0,1	1,0	1,5	2,0	3,0	
<i>L. sativa</i>							
G(%)							
Etanólica	88aA	97aA	79aB	17bC	17bC	2aD	0,79
Aquosa	88aA	95aA	88aA	88aA	83aA	7aB	3,84
IVG							
Etanólica	4,94aA	4,23aA	1,35bB	0,75bC	0,9bBC	0,3aD	
Aquosa	4,94aA	5,12aA	2,25aB	1,98aB	1,61aB	0,33aC	
<i>B. pilosa</i>							
G(%)							
Etanólica	30bA	65aA	48aA	70aA	65aA	3bB	1,17
Aquosa	30bA	50aA	53aA	40bA	33bA	54aA	1,14
IVG							
Etanólica	0,69bB	0,89aA	0,89aA	1,23aA	1,01aA	0,12bB	
Aquosa	0,69bB	0,75aA	1,0aAB	0,7bB	0,54bA	1,9aA	

Legenda: Valores seguidos por letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1 Crescimento inicial

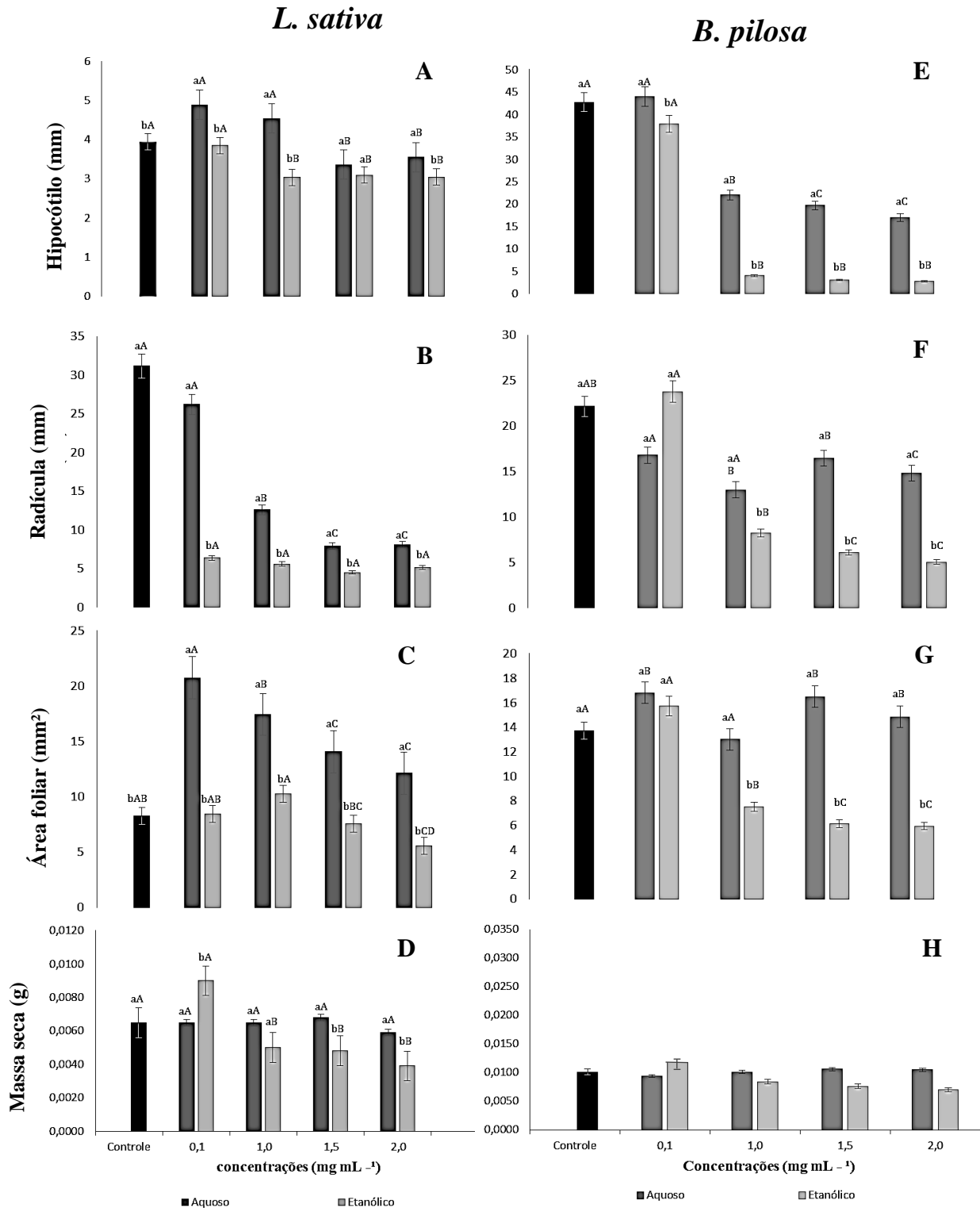
As respostas de crescimento inicial variaram conforme a natureza e concentração da solução dos extratos utilizados, bem como em função da espécie alvo (FIGURA 2). De maneira geral, as soluções etanólicas de *M. laevigata* demonstraram potencial fitotóxico sobre *L. sativa* e *B. pilosa*. Em *L. sativa*, as soluções etanólicas em comparação as aquosas causaram maiores reduções no comprimento da radícula (FIGURA 2A a 2C). Em todas as

concentrações do extrato aquoso as plântulas demonstraram aumento da área foliar em comparação ao controle. A massa seca das plântulas cultivadas sob as menores concentrações (0,1 e 1,0 mg mL⁻¹), os valores mantiveram-se iguais ou superiores, estatisticamente, ao controle, as soluções etanólicas (1,5 e 2,0 mg mL⁻¹) também afetaram negativamente essa variável de resposta (FIGURA 2D).

Para *B. pilosa* as soluções etanólicas em concentrações acima de 1,0 mg mL⁻¹ apresentaram maior potencial alelopático. Em especial no crescimento da parte aérea e da radícula, os maiores impactos ocorreram nas maiores concentrações (2,0 e 3,0 mg mL⁻¹), adequando-se ao modelo dose-redução (FIGURA 2E a 2G). As reduções da radícula foram ~ 77%, mediante utilização da solução etanólica (2,0 mg mL⁻¹) em comparação ao controle. Quanto a morfologia, houve espessamento na região mediana da radícula nas duas espécies alvo (*L. sativa* e *B. pilosa*).

Vale a pena ainda ressaltar que as soluções aquosas de *M. laevigata* até a concentração 1,0 mg mL⁻¹ estimularam o crescimento do hipocótilo da *L. sativa* (FIGURA 2A), indicando um modelo dose-estímulo. Similarmente, as áreas foliares de *L. sativa* (FIGURA 2C) e *B. pilosa* (FIGURA 2G) sofreram expansão na presença do extrato aquoso, com valores superiores aos observados no controle.

Figura 2-Comprimento do hipocótilo (mm); Comprimento da radícula (mm); Área foliar (mm²) e Matéria seca (g) de plântulas de *Lactuca sativa* (A, B, C e D) e *Bidens pilosa* (E, F, G e H) cultivadas na presença de soluções aquosas e etanólicas de *Mikania laevigata* e controle com água destilada.



Legenda: Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. Minúscula para o extrato em cada concentração e maiúscula para a concentração dentro de cada extrato. $N = 50$.

3.2 Teor de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica (MDA)

Em *L. sativa*, o extrato aquoso (TABELA 4 e 5) (2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) e etanólico (1,5 e 2,0 mg mL⁻¹) estimularam o aumento da produção do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ~300% e da peroxidação lipídica (MDA) em ~1000%, em relação ao controle (TABELA 4 e 5). As plântulas de *B. pilosa* submetidas ao extrato aquoso (2,0 e 3,0 mg mL⁻¹), aumentaram em ~700 e 900% a produção de H₂O₂, respectivamente, quando comparado ao controle. As elevações nos níveis desta espécie reativa de oxigênio (H₂O₂) foi seguido do aumento na peroxidação lipídica (MDA) (TABELA 4 e 5), que apresentou valores de ~1000% maiores que os valores da testemunha. As plântulas de ambas as espécies testadas submetidas ao extrato etanólico na concentração 3,0 mg mL⁻¹ necrosaram, tornando-se inaptas as avaliações subsequentes.

Tabela 4-Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plântulas de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* submetidas a cinco concentrações (0; 0,1; 1,0; 1,5; 2 e 3 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.

H ₂ O ₂ (mmol mg ⁻¹ MF)				
<i>Lactuca sativa</i>			<i>Bidens pilosa</i>	
Concentrações (mg mL ⁻¹)	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato aquoso	Extrato Etanólico
0	0,4 f		0,6 e	
0,1	1,1 ab	0,53 cd	1,1 d	1,2 d
1,0	0,85 bc	0,13 e	2,1 c	3,2 d
1,5	0,58 cd	1,35 a	3,4 c	6,4 d
2,0	1,31 a	1,27 a	4,4 abc	7,2 d
3,0	1,21 ab	---	7,3 a	---
C.V. (%)	15		16	

C.V. – coeficiente de variação em porcentagem; MF – massa fresca; --- não avaliado devido à completa necrose dos tecidos vegetais.

Tabela 5-Peroxidação lipídica medida através dos teores de malonaldeído (MDA) em plântulas de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* submetidas a cinco concentrações (0; 0,1; 1,0; 1,5; 2 e 3 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos e etanólicos de *Mikania laevigata*.

MDA (ηmol mg ⁻¹ MF)				
<i>Lactuca sativa</i>			<i>Bidens pilosa</i>	
Concentrações (mg mL ⁻¹)	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato aquoso	Extrato etanólico
0	4,0 g		21,0 f	
0,1	13,0 f	33,0 e	48,0 c	113,0 c
1,0	38,0 de	43,0 cde	113,0 d	172,0 b
1,5	44,0 cde	55,0 c	139,0 c	203,0 a
2,0	50,0 cd	143,0 a	206,0 a	215,0 a
3,0	74,0 b	---	230,0 e	---
C.V. (%)	10		3	

C.V. – coeficiente de variação em porcentagem; MF – massa fresca; --- não avaliado devido à completa necrose dos tecidos vegetais.

4 DISCUSSÃO

A cumarina [1,2-benzopirona] está presente nos extratos da *Mikania laevigata*, como observado por Gasparetto et al. (2010), Czelusniak et al. (2012) e Bolina et al. (2009). Nas maiores concentrações das soluções utilizadas, observaram-se redução da germinação e do vigor das plântulas, e estímulo nas menores concentrações utilizadas.

De acordo com Reigosa et al. (1999), a atividade dos alelopatinos nos diferentes processos fisiológicos são dependentes da concentração, ou ao menos se espera que ocorram estímulos em baixas e inibições em altas. De maneira geral, os alelopatinos atuam modificando a curva de distribuição da germinação, diminuindo (curtose), alongando ou produzindo um padrão complexo na curva através do eixo do tempo, estas alterações sinalizam mudanças nas reações metabólicas das sementes que resulta na redução da germinabilidade (BEWLEY; BLACK, 1978; LABOURIAU, 1983; FERREIRA; AQUILA, 2000).

Segundo Abenavoli et al. (2006) a cumarina inibi a absorção de água pela semente, já na primeira fase (I) da curva de embebição da germinação e reduz o consumo de O₂, provoca inativação de várias enzimas responsáveis pela retomada metabólica e das chaperonas. A reidratação tardia das sementes causada pela cumarina poderia atrasar a estabilização da membrana ou a diminuição do consumo de O₂, estimulando a superprodução de espécies

reativas de oxigênio. O estresse oxidativo resultante pode ter interferido na germinação e na redução do vigor.

Em se tratando do crescimento inicial das plântulas, a radícula da *L. sativa* foi mais sensível a presença dos aleloquímicos, com redução do seu comprimento. O contato direto da extremidade da radícula com o substrato (papel), induz a maior absorção e expressão dos sintomas (DALIRI et al., 2011). Fato que está de acordo com os relatos de Li et al. (2010) em que a cumarina inibiu significativamente o alongamento radicular da alface (*Lactuca sativa* L.).

O espessamento das radículas ocorreu, possivelmente, de um desequilíbrio hormonal da auxina provocado pela cumarina, estimulando a divisão celular e a expansão radial das células, devido a uma vacuolização. Fato relatado por Lupini et al. (2014), quando utilizaram a cumarina em associação com a auxina em experimentos com *Arabidopsis thaliana*.

A fitotoxicidade da cumarina foi descrita por Abenavoli et al. (2003), que ao utilizarem uma concentração 0,25 mM de cumarina, durante seis dias, observaram redução de 50% do tamanho radícula e aumento da espessura da zona apical da raiz em *Arabidopsis thaliana*. Em *Zea mays* L., cv Cecilia, 100 µM de cumarina provocou inibição do desenvolvimento da raiz principal e estimulou o desenvolvimento das raízes secundárias (LUPINI et al., 2010; CHATTHA, MUNAWAR; ASHRAF, 2015).

O estímulo positivo para o crescimento da área foliar evidenciado no presente estudo também foi descrito por Rehorska et al. (2016) ao utilizarem extratos de *Ailanthus altissima* sobre as plântulas de *Lepidium sativum*, onde houve um aumento de 20% no crescimento da parte aérea.

Nas maiores concentrações dos extratos a produção de espécies reativas de oxigênio excedeu a capacidade de controle da célula (H_2O_2), acarretando em dano por peroxidação lipídica (SHARMA et al., 2012). As plantas respondem ao estresse biótico ou abiótico por meio de uma elaborada rede de processos moleculares e bioquímicos, permitindo que as plantas superem e se adaptem a tais situações adversas. Os fosfatos de cálcio, inositol e as espécies reativas de oxigênio (EROs) são elementos comuns das vias de sinalização tanto no estresse biológico quanto abiótico.

Os EROs atuam como mensageiros secundários locais e sistêmicos para desencadear as respostas das plantas, como a expressão de genes sensíveis ao estresse, como abertura e fechamento estomático e reforço da parede celular (APEL; HIRT, 2004). Como fatores de sinalização e proteção, a geração excessiva de EROs é um sinal da toxicidade durante muitos

processos de estresses abióticos ou bióticos (TUTEJA, 2005; MAHAJAN; WANG et al., 2014; DAS et al., 2016; COELHO et al., 2017).

A produção excessiva de EROs em *L. sativa* e *B. pilosa* culminaram com o rompimento da membrana biológica, sinalizado pelo teor de MDA, resultado descrito por Pergo et al. (2008) em *B. pilosa* tratada com cumarina, que aumentou o conteúdo de dienos conjugados, indicando danos oxidativos. A correlação entre o sistema de defesa antioxidante e a resistência ao estresse induzido pela cumarina também foi observada em duas cultivares de arroz por Mahmood et al. (2013).

As soluções aquosas e, principalmente, as etanólicas de *Mikania laevigata* mostraram-se eficazes no controle da germinação e crescimento inicial das duas espécies estudadas, além de induzirem a produção de peróxido de hidrogênio e aumento do teor de malonaldeído, demonstrando-se desta forma seu potencial para bioherbicida.

5 CONCLUSÃO

O extrato etanólico na concentração 3 mg mL^{-1} da *M. laevigata* é promissor como fonte de herbicida natural, pois atua induzindo o estresse oxidativo, necrose dos tecidos e, conseqüentemente, a morte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENAVOLI, M.R.; CACCO, G.; SORGONA A.; MARABOTTINI R.; PAOLACCI A.R.; CIAFFI M.; BADIANI M. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 489–506, 2006.
- ABENAVOLI, M.R.; SORGONA, A.; SIDARI, M.; BADIANI, M.; FUGGI, A. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. **Journal of plant physiology**, v. 1603, p. 227-237, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Instrução Normativa 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/instrucao05_11_12_08> Acesso em: 25 jan. 2018.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol.**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ASLANI, F.; JURAIMI, A.S.; AHMAD-HAMDANI, M.S.; OMAR, D.; ALAM, M.A.; HASHEMI, F.S.G.; HAKIM, M.A.; UDDIN, M.K. Allelopathic effect of methanol extracts from *Tinospora tuberculata* on selected crops and rice weeds. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-soil and Plant Science**, v. 642, p. 165-177, 2017.
- BENICASA, M.M.P. **Análise de crescimento das plantas**. FUNEP, Jaboticabal. 1988.
- BERTOLUCCI, S.K.; PEREIRA, A.B.; PINTO, J.E.; AQUINO, R.J.A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. In: J.D. Bewley and M. Black (Editors), **Development, Germination and Growth**, Vol I. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1978. p.445.
- BOLINA, R.C.; GARCIA, E.F.; DUARTE, M.G.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Society**, v. 26, p. 211-252, 1964.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV. 2009.
- CARMAK, E.; HORST, J. H. Effects of Aluminum on Lipidperoxidation, Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase Activities in Root Tips of Soya Bean (*Glycine max*). **Plant Physiology**, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

- CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F.; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET*, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.
- CHATTHA, F. A.; MUNAWAR, M. A.; ASHRAF, M. Plant growth regulating activities of coumarin-3-acetic acid derivatives. *Allelopathy Journal*, v. 36, n. 2, p. 225-236, 2015.
- COELHO, E.M.P.; BARBOSA, M.C.; MITO, M.S.; MANTOVANELLI, G.C.; OLIVEIRA, J.R.; R.S., ISHII-IWAMOTO, E.L. The Activity of the Antioxidant Defense System of the Weed Species *Senna obtusifolia* L. and its Resistance to Allelochemical Stress. *Journal of Chemical Ecology*, v. 43, n. 7, p. 725–738, 2017.
- CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- DALIRI, M. S.; MAZLOOM, P.; TOUDAR, S.; ABOLFATHI, H. Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare* (L.) Koch.) on germination and growth of seedling thorn-apple (*Datura stramonium* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v. 10, n 6, p. 10000-10005, 2011.
- DAS, S.K.; PATRA, J.K.; THATOI, H. Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: a review. *Hidro Biology*, v. 101, n. 1-2, p. 3–19, 2016.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12 (edição especial), p. 175-204, 2000.
- FORMAGIO, A.S.N.; MASETTO, T. E.; VIEIRA, M. DO C.; ZÁRATE, N. A. H., DE MATOS, A.I.N.; VOLOBUFF, C. R. F. Potencial alelopático e antioxidante de extratos vegetais. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 2, p. 629-638, 2014.
- GASPARETTO, J.C.; CAMPOS, F.R.; BUDEL, J.M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.
- HAIG, T.J.; SEAL, A.N.; PRATLEY, J.E.; AN, M.; WU, H. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. *J. Chem. Ecol.*, v. 35, p. 1129–1136, 2009.
- HISTER, C.A.L.; TRAPP, K.C.; TEDESCO, S.B. Potencial alelopático e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine sobre *Lactuca sativa* L. *Rev. bras. Bioci.*, v. 14, n. 2, p. 124-129, 2016.
- ISMAIL B.S.; HALIMSHAH, S.; WAN, J.W.A.; YUSOFF, N. Allelopathic Potential of the Leaf and Seed of *Pueraria javanica* Benth. on the Germination and Growth of Three Selected Weed Species (Potensi Alelopati Daun dan Benih *Pueraria javanica* Benth. ke atas

Percambahan dan Tumbesaran Tiga Spesies Rumpai). **Sains Malaysiana**, v. 4, n.45, p. 517–521, 2016.

JABRAN, K.; MAHAJAN, G.; SARDANA, V.; CHAUHAN, B. S. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, v. 72, p. 57-65, 2015.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria da OEA, 1983.173p.

LI, ZHAO-HUI.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.; JIANG, D. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LUPINI, A.; ARANITI, F.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana* **Plant Growth Regul.**, v. 74, p. 23–31, 2014.

LUPINI, A.; SORGONÀ, A.; MILLER, A.J.; ABENAVOLI, M.R. Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 11, p. 1395-1400, 2010.

MAPA Formulação de agrotóxicos para suporte fitossanitário. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina_inicial/vegetal/agrotoxicos> Acesso em: 26 de janeiro de 2018.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MAHAJAN. S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 444, p. 139–158, 2005.

MAHMOOD. K.; KHAN, M.B.; SONG, Y.Y.; YE, M.; BAERSON, S.R.; ZENG, R.S. Differential morphological, cytological and biochemical responses of two rice cultivars to coumarin. **Allelopathy J.**, v. 31, p. 281–296, 2013.

PAREPA, M.; SCHAFFNER, U.; BOSSDORF, O. Sources and modes of action of invasive knotweed allelopathy: The effects of leaf litter and trained soil on the germination and growth of native plants. **Neobiota**, v. 13, p. 15–30, 2012.

PERGO, E.M.; ABRAHIM, D.; SILVA, P.C.S.; KERN, K. A.; SILVA, L. J.; VOLL, EMY.; IWAMOTO, L. I. *Bidens pilosa* L. Exhibits High Sensitivity to Coumarin in Comparison with Three Other Weed Species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 499, 2008.

QUAYYUM, H.A.; MALLIK, A.U.; LEACH, D.M.; GOTTARDO, C. Growth inhibitory effects of nutgrass (*Cyperus rotundus*) on rice (*Oryza sativa*) seedlings. **J. Chem. Ecol.**, v. 26, p. 2221–223, 2000.

REHORSKA, R.; JAMNIG, J.; LERNBEISS, J.; DRESCHER, A.; MULLER, M.; PFEIFHOFER, H.W. Growth Stimulating Effects of *Ailanthus altissima* Root and Leaf

Extractives on Radicle and Hipocotyl Growth of Garden Cress (*Lepidium sativum*) and a Possible Evidence for Growth Inhibiting Root Exudates. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v. 56, n. 1, p. 49-59, 2016.

REIGOSA, M.J.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 877-608, 1999.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 1992. 682 p.
SANTOS, J.B.; CURY, J.P. Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. **Planta daninha**, v. 29, p. 1159-1171, 2011.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

SILVA, E.A.S.; LÔBO, L.T.; SILVA, G.A.; FILHO, A. P. S. S.; ARRUDA, M. A. C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, M.S.P. Flavonoids from leaves of *Derris urucu*: assessment of potential effects on seed germination and development of weeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 881-889, 2013.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. **Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance**. In: World Congresso n Computers in Agriculture, 7 Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 1999.

SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Effects of aqueous extracts of *Leucaena* on germination and germination and radicle elongation of tree forage grasses. Pp. 391-395. In: F.A. Macías; J.C.G. Galindo; J.M.G. Molinillo & H.G. Cutler (eds.). **Recent advances in allelopathy** — A science of the future. Cádiz, Espanha, Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz, 2005.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66, 2000.

WANG, H.; XIAO, X.; YANG, M.; GAO, Z.; ZANG, J.; FU, X.; CHEN, Y. Effects of salt stress on antioxidant defense system in the root of *Kandelia candel*. **Bot. Stud.**, v. 55, p. 1–7, 2014.

YAMAMURA K. Transformation using $(x+0.5)$ to stabilize the variance of populations. **Journal Researches on Population Ecology**, v. 42, p. 229-234, 1999.

ZHANG, S. Z. Interference of allelopathic wheat with different weeds. **Pest Management Science**, v. 72, n. 1, p. 172-178, 2016.

ZOBEL, A.M.; BROWN, S.A. Coumarins in the interactions between the plant and its environment. **Allelopathy Journal**, v. 2, p. 9–20, 1995).

ARTIGO 2- REDUÇÃO DO CRESCIMENTO INICIAL E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELOS EXTRATOS FOLIARES DA *Mikania laevigata* (Asteraceae) SOBRE *Lactuca sativa* E *Bidens pilosa* EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO

RESUMO - Os extratos vegetais como fonte de alelopatinos oferecem vantagens no controle das plantas invasoras, pois dificultam o surgimento da resistência e não contaminam os recursos ambientais. Objetivou-se avaliar a atividade fitotóxica dos extratos, aquoso e etanólico, das folhas de *M. laevigata* sobre a germinação, crescimento e estresse oxidativo de *L. sativa* e *B. pilosa* cultivadas em casa de vegetação. Nos bioensaios foram utilizadas cinco concentrações dos extratos (0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) e um controle (água destilada), com cinco repetições de 10 plantas, totalizando 50 plantas por tratamento. Foram avaliados a emergência, comprimento de parte aérea e raiz primária, massa seca total das plântulas, atividade das enzimas, superóxido-dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio. O extrato etanólico, principalmente nas maiores concentrações (2,0 e 3,0 mg mL⁻¹) aumentou o estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX. Concluiu-se que os extratos da *M. laevigata* possui atividade fitotóxica e induz o estresse oxidativo em *L. sativa* e *B. pilosa*, cultivadas em casa de vegetação.

Palavras chave: Plantas invasoras. Alelopatinos. Bioherbicida. Enzimas. Modo de ação.

ABSTRACT - Plant extracts as a source of allelopathies offer advantages in controlling of invasive plants, as they hinder the emergence of resistance and do not contaminate environmental resources. The objective of this study was to evaluate the phytotoxicity of the extracts, aqueous and ethanolic, of the leaves of *M. laevigata* on the germination, growth and oxidative stress of *L. sativa* and *B. pilosa* cultivated in greenhouse conditions. Five concentrations of the extracts (0.1, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg mL⁻¹) and one control with distilled water were tested in the bioassays, with five repetitions of 10 plants, totaling 50 per treatment. The parameters evaluated were emergence, shoot length and primary root, total dry mass of the seedlings, enzyme activity, superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase, lipid peroxidation and hydrogen peroxide content. Ethanolic extract, mainly at higher concentrations (2.0 and 3.0 mg mL⁻¹) increased the oxidative stress, evidenced by the increase in the activity of SOD, CAT and APX enzymes. It was concluded that the extracts of *M. laevigata* have phytotoxic activity and induce oxidative stress in *L. sativa* and *B. pilosa*, grown in a greenhouse.

Keywords: Invasive plants. Allelopathies. Bioherbicide. Enzymes. Mode of action.

1 INTRODUÇÃO

Os extratos vegetais como fonte de alelopatinos oferecem vantagens para o controle das plantas invasoras, pois dificultam o surgimento da resistência, uma vez que o extrato é um fitocomplexo, que, geralmente, as plantas receptoras não são capazes de inativar e possuem amplo modo de ação (QUAYYUM et al., 2000; HISTER; TRAPP; TEDESCO, 2016; ZHANG et al., 2016).

Os experimentos em placas de Petri são simples e de grande valia para identificar a atividade fitotóxica, entretanto recomenda-se que para o entendimento da atuação dos alelopatinos é desejável experimentos em ambientes semicontrolados, como casa de vegetação utilizando substratos como areia, e posteriormente o campo. Substrato como areia é considerada inerte, permitindo que as substâncias bioativas fiquem disponíveis na fase aquosa e possam atingir a planta alvo (INDERJIT; DUKE, 2003).

Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker ou “guaco”, pertencente à família Asteraceae, é nativa da floresta atlântica e cresce espontaneamente em matas primárias, capoeiras, orla de matas, várzeas sujeitas a inundações e possui boa adaptação ao cultivo doméstico (CZELUSNIAK et al., 2012).

Os extratos da *M. laevigata* são ricos em cumarina [1,2-benzopirona] e, com efeito, alelopático sobre *L. sativa*, inibindo a germinação (Barrato et al., 2008). A cumarina é conhecida por interferir na germinação de sementes de trigo (*Triticum turgidum*), de maneira rápida e irreversível (ABENAVOLI et al., 2003; 2006). Atuando durante a fase I da curva de embebição, onde a cumarina impede a absorção de água pela semente.

Outros mecanismos de ação da cumarina estão relacionados ao impedimento do transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração (KUPIDLOWSKA et al., 1994), interferindo nas enzimas do metabolismo do nitrogênio e induzindo estresse oxidativo (ABENAVOLI et al., 2003). Grande parte dos extratos vegetais e alelopatinos isolados provocam vários modos de ação na planta receptora que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (SHARMA et al., 2012). O segundo tipo envolve reações de neutralização ou diminuição da reatividade do radical.

Estudos detalhados com vistas à compreensão do efeito do alelopatino sobre os diferentes parâmetros fisiológicos como a atividade de enzimas antioxidantes, decorrentes da ação do agente estressor sobre plântulas são escassos. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a fitotoxicidade dos extratos (aquosos e etanólicos) da *M. laevigata* sobre a germinação, crescimento inicial e o metabolismo enzimático do estresse oxidativo da *L. sativa* e *B. pilosa* cultivadas em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

M. laevigata Sch. Bip. ex Baker foi cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras-MG, do Departamento de Agricultura. Um exemplar do material foi identificado e depositado no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), sob o número de registro PAMG 57818.

2.2 Preparo dos extratos

As folhas de *M. laevigata* foram secas a 40 °C, por 72h, e trituradas em moinho de facas. Os extratos (10% p/v) foram preparados por sonicação, durante 20 minutos, utilizando como solvente extrator etanol P.A. (Sigma-Aldrich), recomendado por Bertolucci et al. (2008) e água ultrapura, por meio da sonicação. O perfil cromatográfico dos extratos foi determinado por CLAE-DAD.

Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório. Para os ensaios biológicos, os extratos brutos foram ressuspensos nos seus respectivos líquidos extratores para o preparo das soluções de teste nas concentrações 0,1; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹ (Tigre et al., 2012), sendo a água destilada utilizada como controle (ASLANI et al., 2014). As diferentes concentrações dos extratos tiveram o pH e o potencial osmótico aferidos e o potencial osmótico foi determinado pelo método Schardakow (TABELA 1) (MAESTRI et al., 1998).

Tabela 1-Valores de pH (potencial hidrogeniônico) e PO (potencial osmótico) dos extratos das folhas da *M. laevigata*.

Extrato	Concentração (mg mL ⁻¹)	pH	PO (-MPa)
Controle	0	6,8	0,000
	0,1	6,46	0,022
Aquoso	1,0	6,68	0,044
	1,5	6,51	0,067
	2,0	6,56	0,089
	3,0	5,72	0,100
	0,1	6,93	0,026
Etanólico	1,0	6,75	0,030
	1,5	6,23	0,054
	2,0	6,72	0,080
	3,0	6,5	0,107

2.3 Experimento em casa de vegetação

A escolha da espécie *L. sativa* (alface) foi devido à sua rápida germinação, crescimento linear e à sensibilidade na presença dos aleloquímicos (FORMAGIO et al., 2014), enquanto a espécie invasora, *B. pilosa* foi utilizada devido a ampla disseminação e dificuldade do controle em diversas culturas agrícolas (SANTOS; CURY, 2011).

As sementes de *L. sativa* e *B. pilosa* foram previamente distribuídas entre duas folhas de papel de filtro, umedecidos com água destilada, durante cinco minutos, a fim de evitar danos por embebição. Decorrido o tempo, as sementes foram colocadas em contato com diferentes concentrações dos extratos de *M. laevigata* por três horas e semeadas (AUMONDE et al, 2013).

O plantio foi efetuado em bandejas de poliestireno expandida de duzentas células, contendo como substrato areia lavada e esterelizada com características físicas e químicas avaliadas (TABELA 2). O experimento foi conduzido em cinco repetições de dez sementes cada, totalizando 50 sementes por tratamento.

A contagem final do número de plântulas normais emergidas foi feita 21 dias após a semeadura, sendo os resultados expressos em porcentagem (AUMONDE et al. 2013). Os parâmetros avaliados foram: comprimento da raiz primária e parte aérea (mm), área foliar (mm²) e massa seca total (mg) de plântulas, avaliados ao final do teste de emergência em casa de vegetação, por meio de quatro subamostras de 10 plântulas, conforme Silva et al. (2016).

Tabela 2- Características físicas e químicas da areia lavada utilizada para cultivar as espécies *L. sativa* e *B. pilosa* em casa de vegetação.

Análises do solo			
Tipo de solo	1	Mg (cmol/dm ³)	0,1
Argila (dag/kg)	1	Al (cmol/dm ³)	0,00
Areia (dag/kg)	99	H + Al (cmol/dm ³)	0,75
M.O. (dag/kg)	0,18	SB (cmol/dm ³)	0,46
pH	6,7	t (cmol/dm ³)	0,5
K (mg/dm ³)	10	T (cmol/dm ³)	1,2
P (mg/dm ³)	3	V (%)	32,85
Na (mg/dm ³)	---	m (%)	32,85
Ca (cmol/dm ³)	0,3	P-rem (mg/L)	43,84

Legenda: Tipo de solo 1 = Textura arenosa; M.O. = Matéria Orgânica; K = potássio; P = Fósforo; Na = Sódio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Alumínio; SB = Soma de Bases Trocáveis; t = Capacidade de Troca de Cátions Efetiva efetiva; T = Capacidade de Troca de Catiônica; V = Índice de saturação de bases; m = Índice de saturação de alumínio; P-rem = Fósforo remanescente.

2.4 Análise do estresse oxidativo

Foram verificadas as atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, teor de H₂O₂ e o peroxidação lipídica (MDA). As avaliações foram realizadas utilizando amostras de tecido vegetal fresco, provenientes de plântulas coletadas ao final dos 21 dias de semeadura.

A atividade da Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A Catalase (CAT - EC 1.11.1.6) foi determinada pela decomposição do H₂O₂ (MENGUTAY et al., 1998). A ação da ascorbato peroxidase (APX - EC 1.11.1.11) foi mensurada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (AsA), de acordo com Nakano e Asada (1981).

O teor de H₂O₂ foi medido baseado na metodologia empregada por Velikova et al., (2000) e a peroxidação lipídica, via conteúdo do malonaldeído (MDA), por meio da metodologia de Cakmak e Horst (1991).

2.5 Análise estatística

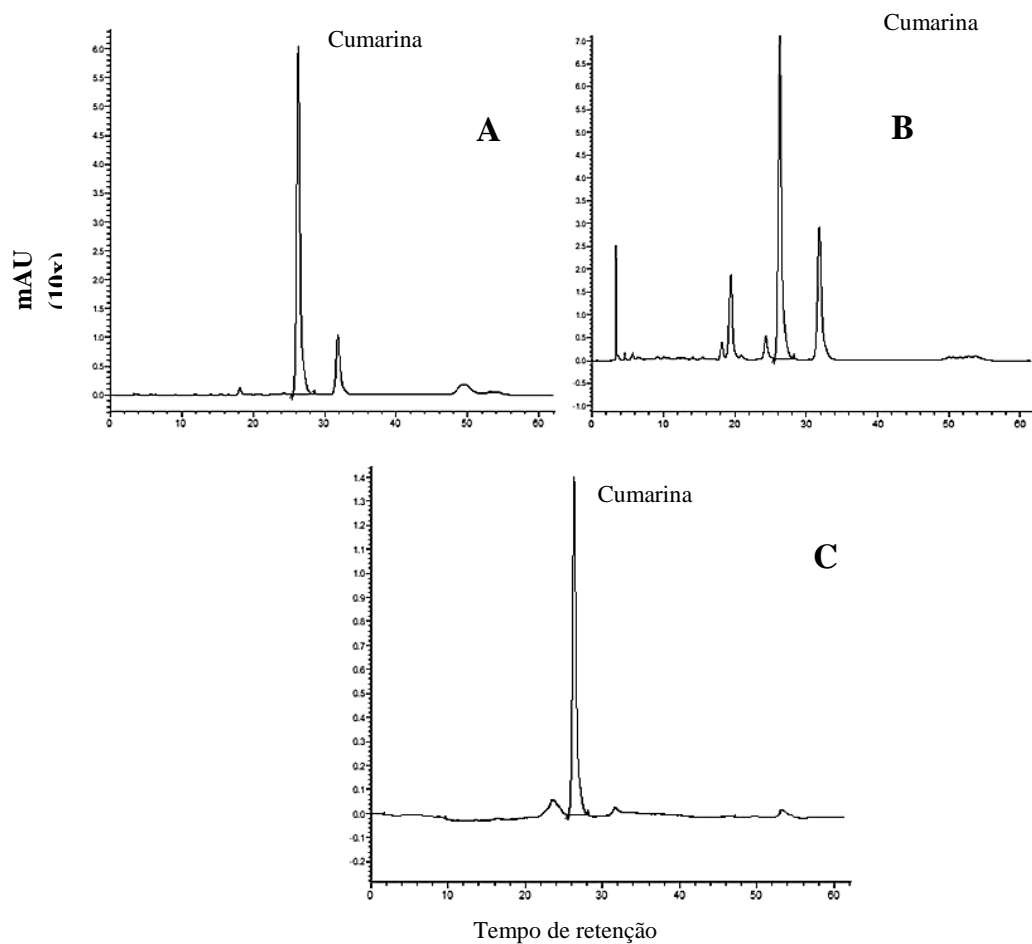
O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições (cinco concentrações de extratos x dois tipos de extrato). Para o tratamento estatístico, os dados foram verificados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade (Levene), ao identificar a normalidade dos dados, empregou-se a ANOVA (*two-way*) (tipo de extrato x

concentrações). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), por meio do programa estatístico Assisat 7.7.

3 RESULTADOS

As análises dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, demonstrados na Figura 1A e 1B, permite observar a presença da cumarina [1,2-benzopirona] nos extratos etanólico e aquoso da *M. laevigata*, comprovado pela similaridade do tempo de retenção com o padrão (FIGURA 1C e TABELA 3).

Figura 1-Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos da *M. laevigata*. Extrato etanólico (A); Extrato aquoso (B); Padrão da cumarina 1,2-benzopirona (concentração $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}$). Detecção em 280nm.



Fonte: Do autor (2018).

Tabela 3-Tempos de retenção e áreas do maior pico em cada extrato e do padrão da cumarina [1,2-benzopirona]

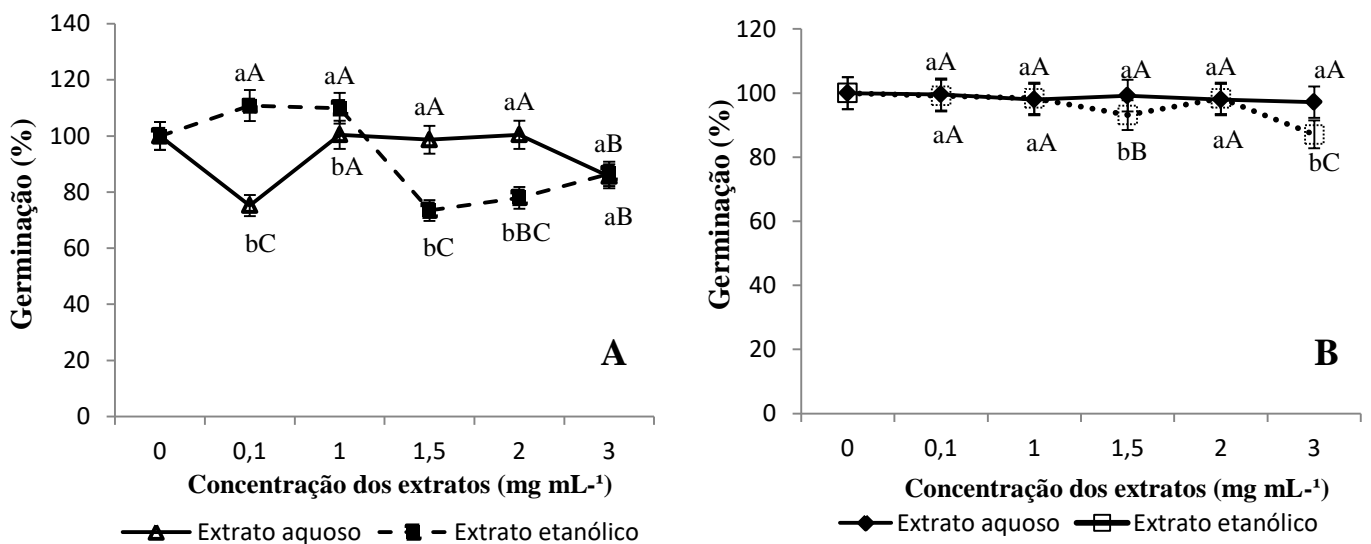
Extratos	Tempo de retenção	Área do pico
Etanólico	26,299	204432045,9
Aquoso	26,360	23822510,1
Padrão (cumarina)	26,344	472,988

3.1 Germinação e crescimento inicial de *L. sativa* e *B. pilosa*

Para *L. sativa*, o extrato aquoso a 0,1 mg mL⁻¹ e etanólico a 1,5 mg mL⁻¹ reduziram ~ 25% e 13% da germinação total, respectivamente (FIGURA 2A). A tabela 4 demonstra as diferenças significativas entre os extratos e as concentrações em cada espécie alvo, com base na ANOVA dois fatores.

Quanto à germinação das sementes da *B. pilosa*, os extratos etanólicos nas concentrações 1,5 e 3,0 mg mL⁻¹ reduziram 7 e 13% da germinação (FIGURA 2B), respectivamente, em relação ao controle.

Figura 2-Efeito dos extratos de *M. laevigata* sobre a porcentagem de germinação em relação ao controle (100%); *L. sativa* (A); *B. pilosa* (B), medidos após 21 dias (N = 50).



Legenda: As barras verticais ao longo de cada ponto de dados representam o erro padrão em porcentagem. Os dados foram analisados por Tukey a 5%. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre as concentrações e médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre os extratos.

Tabela 4-ANOVA dois fatores mostrando valores de F e nível de significância.

Parâmetros	Extrato	Concentração	Extrato x Concentração
<i>Lactuca sativa</i>			
Geminação (%)	0,064 ^{ns}	25,14 ^{**}	61,14 ^{**}
Radícula	101,2 ^{**}	2,23 ^{ns}	2,11 ^{ns}
Hipocótilo	0,26 ^{ns}	2,34 ^{ns}	15,70 ^{**}
Área foliar	2,20 ^{ns}	3,49 ^{**}	7,33 ^{**}
Massa seca	8,70 ^{**}	3,50 [*]	0,77 ^{ns}
<i>Bidens pilosa</i>			
Geminação (%)	22,91 ^{**}	15,15 ^{**}	10,33 ^{**}
Radícula	0,85 ^{ns}	4,61 ^{**}	9,66 ^{**}
Hipocótilo	40,90 ^{**}	2,57 [*]	2,22 ^{ns}
Área foliar	24,11 ^{**}	16,52 ^{**}	3,50 ^{**}
Massa seca	2,29 ^{ns}	0,75 ^{ns}	1,00 ^{ns}

ns valores não significativos

* diferença significativa $P < 0,05$

**diferença significativa $P < 0,001$

A radícula e a massa seca total das plântulas da *L. sativa* provenientes do teste de crescimento em casa de vegetação, não foram afetadas pelos extratos da *M. laevigata* (TABELA 5). Em relação à variável crescimento do hipocótilo e a área foliar observaram-se reduções de ~10,3 e 6,8% nas concentrações 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹ do extrato etanólico, respectivamente, em relação ao controle (TABELA 5).

O crescimento radicular da *B. pilosa* foi afetado negativamente pelos extratos da *M. laevigata* (TABELA 6), principalmente em 3,0 mg mL⁻¹ do extrato etanólico que diminuiu ~ 26% do comprimento, se comparado aos valores do controle. Os extratos aturam estimulando o desenvolvimento da área foliar em ~ 21% ao utilizar o extrato aquoso (2,0 mg mL⁻¹) e 7% ao utilizar o extrato etanólico (1,5 mg mL⁻¹), o hipocótilo e a massa seca total das plântulas não foram afetadas significativamente.

Tabela 5-Comprimento da radícula, hipocótilo, área foliar e massa seca total das plântulas de *L. sativa*. Medidos após 21 dias de cultivo em casa de vegetação (N = 10). Submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em cinco concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg mL⁻¹)

Extrato	Concentração (mg mL ⁻¹)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Área foliar (mm ²)	Massa seca (mg)
Controle	0	46,9 ^{ns}	8,4 bB	37,2 aB	0,022 ^{ns}
Aquoso	0,1	37,5 ^{ns}	12,8 aA	37,3 aB	0,022 ^{ns}
	1,0	40,8 ^{ns}	10,9 aA	40,9 aAB	0,025 ^{ns}
	1,5	37,9 ^{ns}	9,31 bB	37,5 aB	0,025 ^{ns}
	2,0	37,8 ^{ns}	8,7 bB	45,02 aA	0,025 ^{ns}
	3,0	33,5 ^{ns}	8,9 aB	39,4 aAB	0,023 ^{ns}
Etanólico	0,1	46,4 ^{ns}	11,6 aA	38,9aABC	0,021 ^{ns}
	1,0	49,9 ^{ns}	10,5 aAB	45,0 aA	0,024 ^{ns}
	1,5	45,9 ^{ns}	9,5 aB	40 aAB	0,020 ^{ns}
	2,0	46,2 ^{ns}	9,4 bB	33,4 bC	0,023 ^{ns}
	3,0	46,3 ^{ns}	9,0 bB	34,7 aBC	0,017 ^{ns}
C.V. (%)		24	27	30	14

Legenda: Letras minúsculas comparam os extratos e as letras maiúsculas as diferentes concentrações em relação aos parâmetros biométricos. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Tukey. *ns* valores não significativos ; C.V. (%) – coeficiente de variação em porcentagem.

Tabela 6-Comprimento da radícula, hipocótilo, área foliar e massa seca total das plântulas de *B. pilosa*. Medidos após 21 dias de cultivo em casa de vegetação (N = 10). Submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em cinco concentrações (0,1; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg mL⁻¹)

Extrato	Concentração (mg mL ⁻¹)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Área foliar (mm ²)	Massa seca (mg)
Controle	0	51,1 aA	27,7 ^{ns}	36,3 aA	0,03 ^{ns}
Aquoso	0,1	42,8 aA	27,8 ^{ns}	39,3 aA	0,029 ^{ns}
	1,0	43,4 aA	25,6 ^{ns}	34,0 aAB	0,027 ^{ns}
	1,5	41,0 bA	26,7 ^{ns}	28,6 bB	0,032 ^{ns}
	2,0	43,9 aA	26,6 ^{ns}	35,5 bA	0,03 ^{ns}
	3,0	45,0 aA	28,1 ^{ns}	38,3 aA	0,03 ^{ns}
Etanólico	0,1	43,4 aA	29,1 ^{ns}	40,5 aA	0,031 ^{ns}
	1,0	47,4 aB	29,7 ^{ns}	34,8 aAB	0,032 ^{ns}
	1,5	55,3 aBC	28,4 ^{ns}	34,6 aAB	0,032 ^{ns}
	2,0	38,3 bC	28,7 ^{ns}	45,4 aC	0,031 ^{ns}
	3,0	37,6 bC	29,7 ^{ns}	42,4 aC	0,031 ^{ns}
C.V. (%)		20	13	23	12

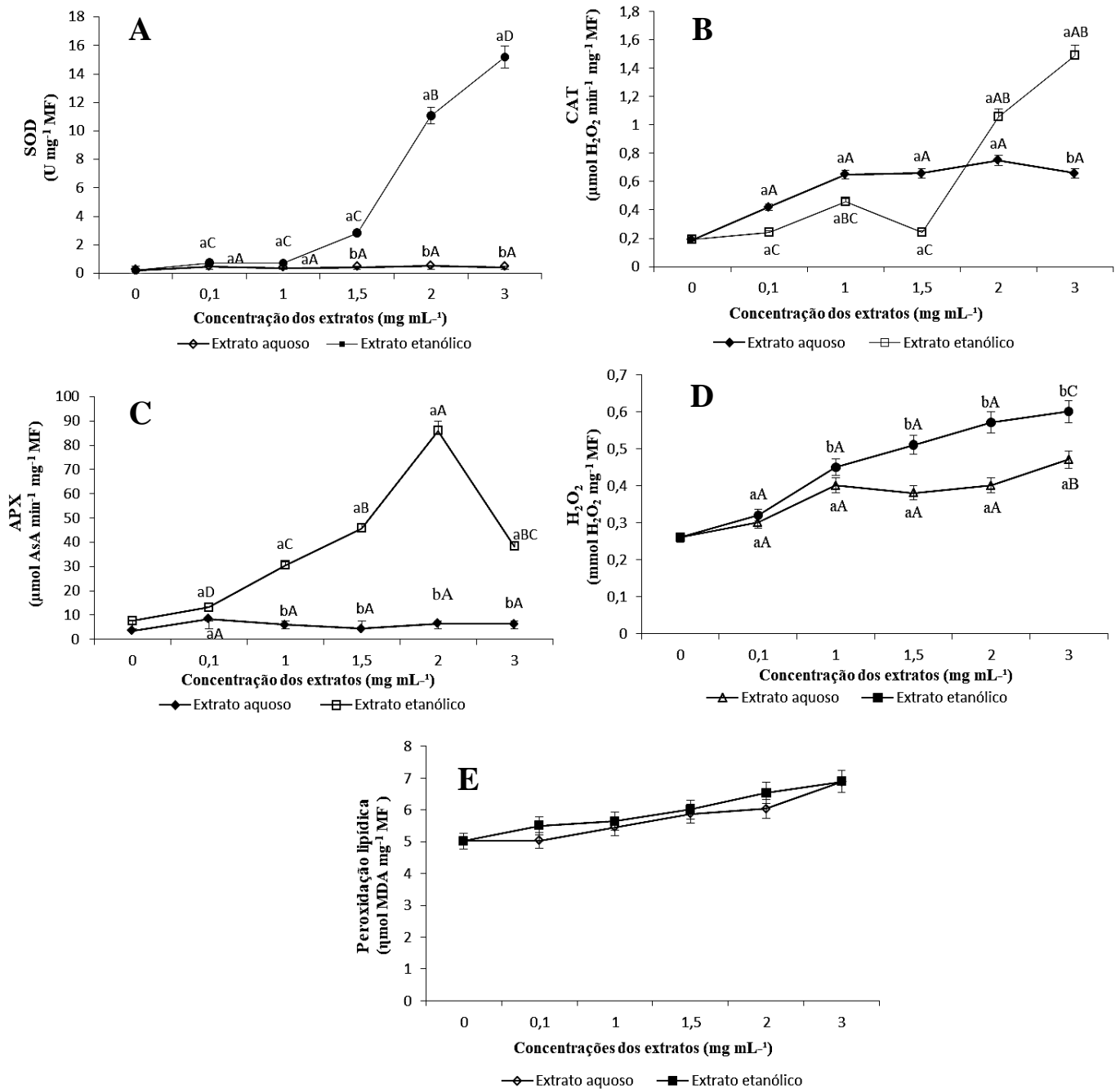
Legenda: Letras minúsculas comparam os extratos e as letras maiúsculas as diferentes concentrações em relação aos parâmetros biométricos. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Tukey. *ns* valores não significativos; C.V. (%) – coeficiente de variação em porcentagem.

3.2 Análises do estresse oxidativo

A atividade da enzima antioxidante SOD (FIGURA 3A, 3B), presente em *L. sativa* aumentou proporcionalmente em relação à concentração do extrato etanólico, e a CAT demonstrou o comportamento dose-reposta a partir da concentração 1,5 mg mL⁻¹ do extrato etanólico. A atividade dessas duas enzimas implica que o peróxido de hidrogênio está sendo produzido, principalmente a CAT que possui elevada afinidade pelo H₂O₂. Na quantificação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) (FIGURA 3C), ocorreram aumentos até a concentração 2,0 mg mL⁻¹ do extrato etanólico, seguida de uma queda abrupta na concentração 3,0 mg mL⁻¹.

Os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *L. sativa* (FIGURA 3D), tratadas com as soluções etanólicas, foram maiores se comparado às plântulas cultivadas com os extratos aquosos. Em relação à peroxidação lipídica, dada em relação ao teor de malonaldeído (MDA), não houve diferença significativa entre os tratamentos (FIGURA 3E).

Figura 3-Superóxido dismutase – SOD (A); Catalase – CAT (B); Peroxidase do ascorbato – APX (C); Teor de Peróxido de hidrogênio (D); Peroxidação lipídica (E) em *Lactuca sativa* submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em diferentes concentrações. Plântulas cultivadas durante 21 dias em casa de vegetação (N=5).

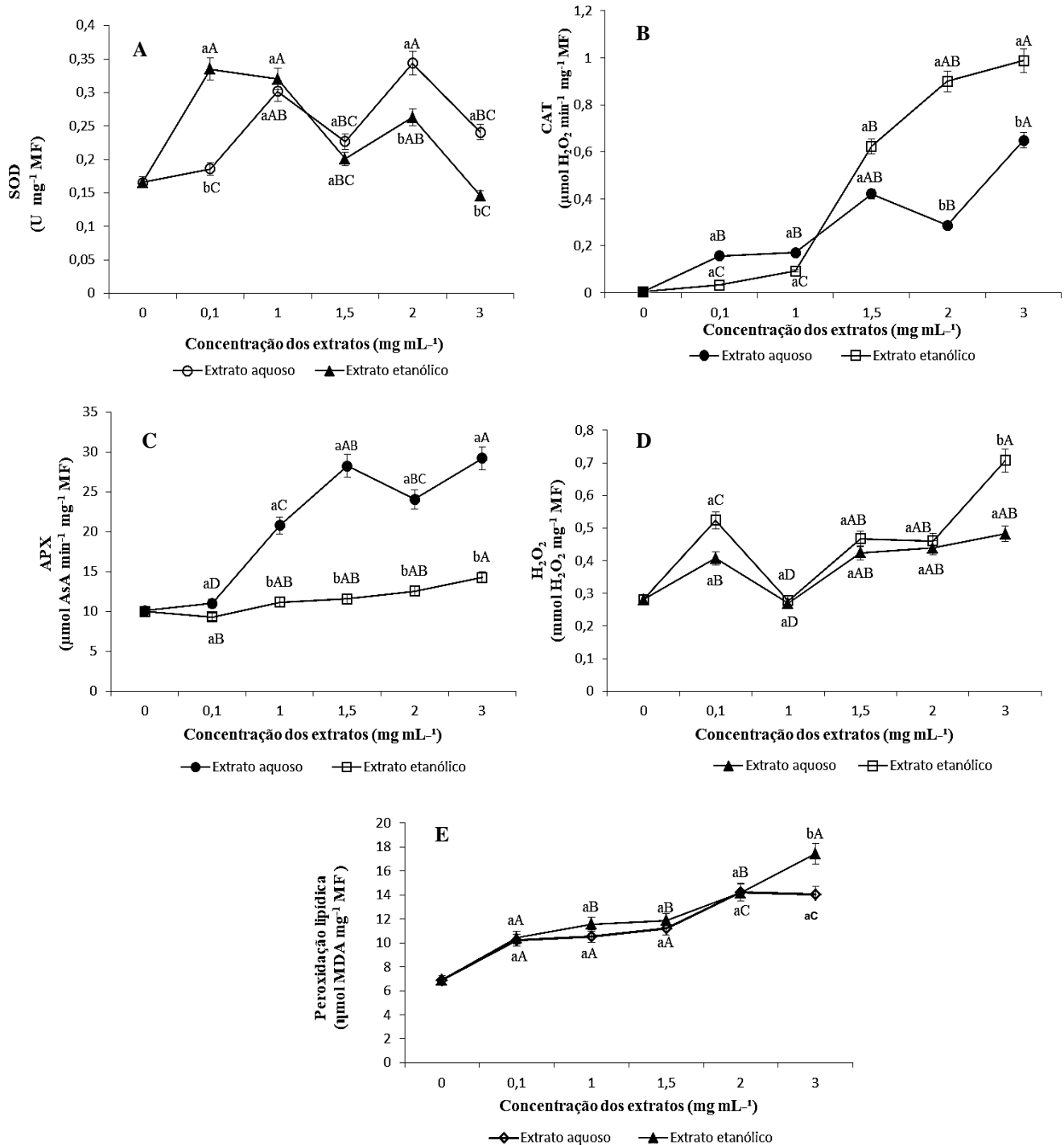


Legenda: MF = massa fresca. Letras maiúsculas comparam as concentrações e as letras minúsculas os extratos em relação à atividade enzimática. Letras diferentes indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Tukey.

A atividade da SOD foi dependente da concentração e do extrato. A máxima atividade da SOD foi observada em plântulas tratadas com o extrato etanólico na concentração 0,1 mg mL⁻¹ (FIGURA 4A) e para o extrato aquoso na concentração de 2,0 mg mL⁻¹, diminuindo significativamente na concentração de 3,0 mg mL⁻¹ em ambos os extratos, em que valor da atividade foi abaixo do observado no controle. A cinética da CAT (FIGURA 4B) e APX (FIGURA 4C) seguiu o modelo dose-reposta para ambos os extratos testados, todavia a atividade foi maior quando empregado o extrato etanólico.

Em plântulas da *B. pilosa* submetidas aos extratos da *M. laevigata* a produção de peróxido de hidrogênio (FIGURA 4D) e a peroxidação lipídica (FIGURA 4E) foram maiores quando empregado as soluções do extrato etanólico, pode-se observar na Figura 4E que o valor máximo da peroxidação lipídica foi observado ao empregar o extrato etanólico na maior concentração (3,0 mg mL⁻¹).

Figura 4-Superóxido dismutase – SOD (A); Catalase – CAT; (B); Peroxidase do ascorbato – APX (C); Teor de Peróxido de hidrogênio (D); Peroxidação lipídica (E) em *Bidens pilosa* submetidas aos extratos aquosos e etanólicos da *M. laevigata* em diferentes concentrações. Plântulas cultivadas durante 21 dias em casa de vegetação (N=5).



Legenda: MF = massa fresca. Letras maiúsculas comparam as concentrações e as letras minúsculas os extratos em relação à atividade enzimática. Letras diferentes indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Tukey.

4 DISCUSSÃO

Os extratos da *M. laevigata*, reduziu a germinação e provocou uma desuniformização do padrão germinativo em *L. sativa*. Entretanto, a atividade foi menor do que o observado por Baratto et al. (2008) ao utilizarem o extrato etanólico (*M. laevigata*) sobre *L. sativa*, em placas de Petri. Em seu estudo, Oliveira et al. (2014) observaram que a taxa de germinação da alface cultivada em casa de vegetação foi pouco afetada pelo extrato etanólico de *Palicourea rigida*, que possui cumarina em sua composição.

O método de aplicação e a concentração dos produtos são fatores importantes na expressão da atividade fitotóxica (CRUZ et al., 2000) pela planta receptora do extrato vegetal. Vale ressaltar também que os extratos vegetais possuem vários aleloquímicos que podem apresentar atividades antagônicas, principalmente em ambientes semicontrolados (casa de vegetação), em que outros fatores podem atuar, dificultando o aparecimento dos sintomas nas plântulas.

Em *B. pilosa*, o crescimento da radícula foi afetado negativamente (~17 %), principalmente no extrato etanólico (3,0 mg mL⁻¹). Essas reduções são bem menores se comparado ao encontrado por Aliota e Sacchi (1994), em que a diminuição das radículas da *L. sativa* atingiu até 40%, quando cultivadas junto ao extrato etanólico de *Ruta graveolens* (possui cumarina). É amplamente difundido na literatura que plantas que contenham cumarina em sua composição causem efeitos alelopáticos em diversas espécies, em ambiente natural ou controlado, como evidenciado por Chou et al. (2010), em que o pó das folhas de *Rhododendron formosanum*, rica em cumarina, sobre *B. pilosa*, provocou reduções no crescimento da radícula e da parte aérea. Pergo et al. (2008) também acrescentou que em concentrações acima 50 µM de cumarina sobre *B. pilosa*, a germinação e a atividade da lipoxigenase foram reduzidas, aumentando o estresse oxidativo.

Por exemplo, a umbeliferona, quimicamente descrita como 7-hidroxycumarina, induziu a paralisação do ciclo celular na fase S em células HepG2 (YU et al., 2015). Além disso, a aplicação exógena da cumarina causou inibição severa do crescimento de células de cenoura em cultura em suspensão (ABENAVOLI et al., 2003).

Nas plantas, várias moléculas sinalizam a morte celular programada, incluindo as espécies reativas de oxigênio (EROs) (PETROV et al., 2015). As plantas produzem vários tipos de EROs, entre eles, o peróxido de hidrogênio H₂O₂ que pode se transformar em outros EROs e radicais livres prejudiciais (KOOKKAEW et al., 2012). Em nosso estudo, o conteúdo H₂O₂ foi quantificado. Semelhante ao observado por Araniti et al. (2017) em *Arabidopsis*

thaliana, a cumarina [1,2-benzopirona] induziu a formação de H_2O_2 e desencadeou vários eventos fisiológicos, como alterações na fluorescência da clorofila *a*.

No presente estudo, a atividade das enzimas antioxidantes nas espécies alvo apresentaram diferentes cinéticas após o tempo de cultivo em casa de vegetação. Houve um aumento progressivo na atividade da SOD em *L. sativa*, quando utilizado o extrato etanólico. Como principal responsável pela remoção das espécies reativas de oxigênio, a superóxido dismutase (SOD) é considerada uma enzima chave, sendo responsável por captar o superóxido e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pelo processo de dismutação (GILL; TUTEJA, 2010).

Cao et al. (2006) relataram que as enzimas antioxidativas protegeram as mudas de *A. thaliana* contra o estresse oxidativo. Assim, neste trabalho, o aumento da indução de CAT em *L. sativa* e *B. pilosa* provavelmente servem como mecanismo de proteção contra o estresse induzido pelos extratos. A CAT está presente nos peroxissomos e atua degradando o H_2O_2 em oxigênio e água (MOLLER et al., 2006). Bem como a APX, que utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio à água (PEREIRA et al., 2010). Logo, um aumento da geração de H_2O_2 , como observado em *L. sativa* e *B. pilosa*, foi seguido por um aumento da atividade de outras enzimas responsáveis pela sua eliminação. Todavia, a atividade da enzima APX em *L. sativa* foi reduzida ($3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ do extrato etanólico), isso pode ser decorrente do aumento das atividades da SOD e CAT, que resultou na diminuição do estímulo na atividade (PEREIRA et al., 2010).

Em outro estudo, Yan et al. (2016) testaram extratos de *Stellera chamaejasme*, rica em algumas cumarinas, observaram que as plântulas da *L. sativa* reduziram a divisão celular e o crescimento, mediante ao estresse oxidativo. A cumarina está amplamente associada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ABENAVOLI et al., 2006; RAZAVI et al., 2011; COELHO et al., 2017).

As EROs estão diretamente relacionadas às causas de danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (SHARMA et al., 2012), modificando a permeabilidade, levando a destruição dos cloroplastos, mitocôndrias, núcleo e retículo endoplasmático (SILVA et al., 2016), podendo reduzir o crescimento das plantas, devido à redução da fotossíntese e aumento da respiração (ALMEIDA et al., 2008). Possivelmente, o aumento do H_2O_2 e de outras espécies reativas de oxigênio, provocaram o início da degradação da membrana lipídica, devido o aumento do MDA. O malonaldeído é um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-

insaturados (constituintes da membrana lipídica), formado durante o processo oxidativo (OSAWA et al., 2005).

Apesar da tendência do aumento na produção de peróxido de hidrogênio e MDA em *L. sativa* o sistema de defesa antioxidante pode ter exercido um papel importante na tolerância às condições de estresse (NORSWORTHY; OLIVEIRA, 2006), uma vez que a maioria dos parâmetros de crescimento inicial não foram afetados negativamente, isso devido as atividades das enzimas antioxidantes que podem mitigar o dano oxidativo causado por EROs, reduzindo assim a eficácia dos aleloquímicos. Entretanto, em *B. pilosa* a produção do malonaldeído foi mais acentuada, sinalizando maior sensibilidade ao extrato como relatado por Pergo et al. (2008).

5 CONCLUSÃO

O extrato etanólico da *M. laevigata* nas concentrações 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹ reduziu a germinação em *B. pilosa* e *L. sativa*, e estimulou a produção de peróxido de hidrogênio, acompanhado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). As enzimas conseguiram reverter os efeitos nocivos dos EROs em *L. sativa*, gerados durante a germinação das sementes e do crescimento inicial. *B. pilosa* mostrou-se mais sensível ao extrato com maior produção do MDA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENAVOLI, M. R.; CACCO, G.; SORGONA, A.; MARABOTTINI, R.; PAOLACCI, A. R.; CIAFFI, M.; BADIANI, M. The Inhibitory Effects of Coumarin on the Germination of Durum Wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) Seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 2, p. 489-506, 2006.
- ABENAVOLI, M.R.; SORGONA, A.; SIDARI, M.; BADIANI, M.; FUGGI, A. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. **Journal of plant physiology**, v. 160, n. 3, p. 227-237, 2003.
- ALIOTTA, G.; CAFIERO, G.; DEFEO, V.; SACCHI, R. Potential allelochemicals from ruta-graveolens l and their action on radish seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2761-2775, 1994.
- ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M.C.; COELHO, I.; SOBREIRA, F.M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomia**, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ARANITI, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; CHAMBERY, A.; RUSSO, R.; ESPOSITO, A.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated -omic approach. **Journal of Plant Physiology**, v. 213, p. 30-41, 2017.
- ASLANI, F.; JURAIMI, A.S.; AHMAD-HAMDANI, M.S.; OMAR, D.; ALAM, M.A.; HASHEMI, F.S.G.; HAKIM, M.A.; UDDIN, M.K. Allelopathic effect of methanol extracts from *Tinospora tuberculata* on selected crops and rice weeds. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-soil and Plant Science**, v. 64, n. 2, p. 165-177, 2014.
- AUMONDE, T.Z.; MARTINAZZO, E.G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F.A.; MORAES, D.M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3181-3192, 2013.
- BARATTO, L.; LANG, K. L.; VANZ, D. C.; REGINATTO, F. H.; OLIVEIRA, J.B.; FALKENBERG, M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 577-582, 2008.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA S.P.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BERTOLUCCI, S.K.; PEREIRA, A.B.; PINTO, J.E.; AQUINO, R.J.A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2008.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. In: J.D. Bewley and M. Black (Editors), **Development, Germination and Growth**, Vol I. Berlin; New York: Springer-Verlag. 1978. p.445.

CAKMAK, I.; WALTER J. H. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v. 83, p. 463-168, 1991.

CAO, S.; JIANG, S.; ZHANG, R. The Role of *GIGANTEA* Gene in Mediating the Oxidative Stress Response and in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 48, n. 3, p. 261–270, 2006.

CHOU, S. C.; HUANG, C. H.; HSU, T. W.; WU, C. C.; CHOU, C. H. Allelopathic potential of *Rhododendron formosanum* Hemsl in Taiwan. **Allelopathy Journal**, v. 25, n. 1, v. 73-91, 2010.

COELHO, E. M.P.; BARBOSA, M. C.; MITO, M. S.; MANTOVANELLI, G. C.; OLIVEIRA JR, R. S.; ISHII-IWAMOTO, E.L. The Activity of the Antioxidant Defense System of the Weed Species *Senna obtusifolia* L. and its Resistance to Allelochemical Stress. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 7, p. 725–738, 2017.

CRUZ, S. E. M.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 15, p. 28-34, 2000.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; VIEIRA, M. DO C.; ZÁRATE, N. A. H.; DE MATOS, A. I. N.; VOLOBUFF, C. R. F. Potencial alelopático e antioxidante de extratos vegetais. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 629-638, 2014.

GIANNOPOLITIS, C, N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases: II. Purification and Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. **Plant Physiol.**, v. 59, n. 2, p; 315-8, 1977.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HISTER, C.A.L; TRAPP, K.C.; TEDESCO, S.B. Potencial alelopático e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine sobre *Lactuca sativa*. *Rev. Bras. Bioci.*, v. 14, n. 2, p. 124-129, 2016.

INDERJIT E DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.

KOODKAEW, I.; SUNOHARA, Y.; MATSUYAMA, S.; MATSUMOTO, H. Phytotoxic action mechanism of hapalocyclamide in lettuce seedlings. **Plant Physiol Biochem.**, v. 58, p. 23–28, 2012.

- KUPIDLOWSKA, E.; KOWALEC, M.; SULKOWSKI, G.; ZOBEL, A. M. The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristematic cell protoplast. **Ann. Bot.**, v. 73, p. 525–530, 1994.
- MAESTRI, M.; ALVIM, P. T.; SILVA, M. A. P.; MOSQUIN, P. R.; PUSHMANN, R. CANO, M. A. O. (1998) BARROS, R. S. **Fisiologia Vegetal: exercícios práticos**. 4ª Reimpressão (2002). Viçosa: UFV.
- MENGUTAY, M.; CEYLAN, Y.; KUTMAN, U. B.; ÇAKMA, I. Adequate magnesium nutrition mitigates adverse effects of heat stress on maize and wheat. **Plant and Soil**, v. 368, n. 1-2, p. 57–72, 2013.
- MØLLER P.; LOFT S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. **Free Radic Biol Med.**, v. 41, p. 388–415, 2006.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NORSWORTHY, J.K.; OLIVEIRA, M.J. Sicklepod (*Senna obtusifolia*) germination and emergence as affected by environmental factors and seedling depth. **Weed Sci.**, v. 54, p. 903–909, 2006.
- OLIVEIRA, A.K.M.; MATIAS, R.; LOPES, S.S.; FONTOURA, F.M. Allelopathy and Influence of Leaves of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) on Seed Germination and Seedling Formation in Lettuce. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 938-947, 2014.
- OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quím. Nova.**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.
- PEREIRA, F.J.; MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; CASTRO, E. M.; ALVES, J.D. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesq. agropec. bras.**, v. 45, n. 5, p. 450-456, 2010.
- PERGO, E.M.; ABRAHIM, D.; DA SILVA, P.C.S.; KERN, K.A.; DA SILVA, L.J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E.L. *Bidens pilosa* L. Exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 4, p. 499-507, 2008.
- PETROV, V.; HILL, J.; MUELLER-ROEBER, B.; TSANKO S.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 69, p. 1-16, 2015.
- QUAYYUM, H.A.; MALLIK, A.U.; LEACH, D.M.; GOTTARDO, C. Growth inhibitory effects of nutgrass (*Cyperus rotundus*) on rice (*Oryza sativa*) seedlings. **J. Chem. Ecol.**, v 26, p. 2221–223, 2000.
- RAZAVI, S. M.; ZARRINI, G.; RAD, F. G. Isoarnottinin 4'-glucoside, a glycosylated coumarin from *Prangos uloptera*, with biological activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 240, 2011.

SANTOS, J.B.; CURY, J.P. Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. **Planta daninha**, v. 29, p. 1159-1171, 2011.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

SILVA, C.B.; OLIVEIRA, M.; DIAS, J.F.; ZANIN, S.M.W.; SANTOS, G.O.; CÂNDIDO, A.C.S.; PERES, M.T.L.P.; SIMIONATTO, E.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.1. Atividade alelopática dos lixiviados de *Asemeia extraaxillaris* (Polygalaceae) sobre o crescimento de *Ipomoea cordifolia*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 1, p. 215-222, 2016.

SILVA, T.A.; DELIAS, D.; PEDÓ, T., ABREU, E.S.; VILLEL, F.A.; AUMONDE, T.Z. Fitotoxicidade do extrato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist no desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface. **Iheringia. Série Botânica**, v. 71, n. 3, p. 213-221, 2016.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66, 2000.

YAN, Z.; WANG, D.; CUI, H.; ZHANG, D.; SUN, Y.; JIN, H.; LI, X.; YANG, X.; GUO, H.; HE, X.; PAN, L.; REN, X.; GUO, K.; QIN, B. Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 248, 2016.

YU, S.M.; HU, D.H.; ZHANG, J.J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 13, p. 3869-3873, 2015.

ZHANG, S. Z. Interference of allelopathic wheat with different weeds. **Pest Management Science**, v. 72, n 1, p. 172-17, 2016.

ARTIGO 3- CUMARINA [1,2-BENZOPIRONA] INIBE A GERMINAÇÃO, ALTERA A CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA E OS TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS EM PLANTAS ADULTAS DE *Lactuca sativa*

RESUMO - A cumarina, 1,2- benzopirona é uma lactona do ácido hidroxicinâmico com variadas atividades biológicas, incluindo fitotóxica. Neste estudo, investigaram-se o potencial fitotóxico desta molécula, realizando bioensaios, *in vitro*, sobre germinação de sementes e crescimento radicular (*L. sativa*), e as principais alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas adultas da alface (quatro semanas). A cumarina reduziu fortemente o peso fresco das folhas, seguida de alterações no potencial hídrico, redução na condutância estomática e na respiração. As análises demonstraram aumento no acúmulo do aminoácido prolina e redução do conteúdo de proteínas totais. Não afetou o potencial osmótico das folhas, mas induziu a concentração dos carotenoides em plantas adultas da *L. sativa*.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Bioherbicida. Fitotoxicidade. Repostas fisiológicas.

ABSTRACT - Coumarin, 1,2-benzopyrone is a hydroxycinnamic acid lactone with many biological activities, including phytotoxicity. In this study, the phytotoxic potential of this molecule was investigated, performing *in vitro* bioassays on seed germination and root growth (*L. sativa*), and the main biochemical and physiological changes in adult lettuce plants (four weeks). Coumarin strongly reduced leaf fresh weight, followed by changes in water potential, reduction in stomatal conductance and respiration. The analyzes demonstrated an increase on the accumulation of the amino acid proline and reduction of the total protein content. It did not affect the osmotic potential of the leaves, but induced the concentration of carotenoids in *L. sativa* adult plants.

Keywords: Secondary metabolites. Bioherbicide. Phytotoxicity. Physiological responses.

1 INTRODUÇÃO

Agências de regulamentação e conferências (EcoPhyto2018 and EcoPhyto 2, na França), principalmente europeias, estimulam a indústria a buscar novos produtos fitossanitários baseados em moléculas naturais, que sejam eficazes em baixas quantidades e reduzida toxicidade para o ambiente e a saúde dos humanos (DUMAS et al., 2017).

Dentre essas moléculas de origem natural, as coumarinas são um amplo grupo de metabolitos secundários originados na rota do ácido chiquímico. Nas plantas, são encontradas em folhas, sementes e frutos (ZOBEL; BROWN, 1995). Após a liberação no ambiente, as coumarinas são facilmente difundidas no solo, podendo afetar outras plantas e provocar efeitos fitotóxicos (RAZAVI, 2011; NEBO et al., 2014; YAN et al., 2016).

São geralmente relacionadas à defesa da planta, pois sua biossíntese é induzida em condições estressantes (KAI et al., 2006). A umbeliferona é um exemplo de coumarina que aumenta o estresse oxidativo e afeta a divisão celular em *L. sativa*, diminuindo o crescimento da planta (YAN et al., 2016). Em estudo recente, Graña et al. (2017) relataram que a coumarina alterou a organização dos microtúbulos, provocou a despolarização da membrana mitocondrial e induziu a morte celular. Existe também o relato que o uso de coumarinas sintéticas aumentou a efetividade na inibição do crescimento e redução dos pigmentos fotossintéticos em *A. thaliana* (ARANITI et al., 2015).

A coumarina, 1,2 benzopirona, é o composto mais simples da classe, capaz de inibir a germinação em trigo (*Triticum turgidum*), alterar a morfologia das raízes de *A. thaliana* e interferir nas enzimas do metabolismo do nitrogênio (ABENAVOLI et al., 2001; 2006; 2008). Recentemente, foi descrito a capacidade da interação da coumarina no funcionamento do transporte polar da auxina (ácido-3-indol acético, AIA), afetando o transportador AUX1 (LUPINI et al., 2014), a diminuição da fluorescência da clorofila *a* e a indução do estresse oxidativo em *A. thaliana* (ARANITI et al., 2017).

Apesar do amplo conhecimento apresentado sobre a atuação da coumarina não é sabido quais as principais alterações bioquímicas e fisiológicas provocadas em plantas da *L. sativa*. Diante do exposto objetivou-se caracterizar as alterações fisiológicas e bioquímicas como respostas do estresse biótico induzido pela coumarina sobre a espécie *L. sativa*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bioensaios de germinação e de crescimento radicular

Os bioensaios de germinação e crescimento radicular foram realizados com a espécie *Lactuca sativa* cv. Great Lakes (Califórnia). A superfície das sementes foi esterilizada com uma solução de NaClO 15% (v/v) durante 15 min e depois lavadas três vezes com água destilada. Foram utilizadas 25 sementes, em cada repetição, que foram distribuídas uniformemente em placas de Petri (9 cm de Ø) forradas com papel Whatman. As placas foram umedecidas com 4 mL da solução de diferentes concentrações de cumarina (1,2-benzopirona).

A Cumarina (Sigma Aldrich®) foi solubilizada em EtOH (P.A.) e diluída em água destilada para as seguintes concentrações 0 (controle), 25, 50, 75, 150 e 300 µM. As placas de Petri foram então colocadas em uma câmara de crescimento a 27 °C e 70% de umidade relativa. O experimento foi realizado em condições escuras. As sementes germinadas foram contadas a cada 3 horas durante 24 h, foram consideradas germinadas quando a raiz atingiu o comprimento de ≥ 1 mm de comprimento. Usando valores de Chiapusio et al. (1997) ao final destas observações, a taxa de germinação total [GT_(%)], a velocidade média de germinação (S) e a velocidade de germinação acumulada (AS) foram calculadas. Juntamente com esses cálculos, foi produzida uma curva dose-resposta para a concentração (µM) de cumarina que causa inibição de 50% (IC₅₀) da germinação.

Para estudar de forma independente os efeitos da cumarina sobre o crescimento das raízes e evitar a interferência dos efeitos da cumarina sobre a germinação, foram selecionadas sementes pré-germinadas (vinte e cinco) com comprimento uniforme da raiz, colocadas em placas de Petri estéreis e tratadas, com as soluções de concentrações de cumarina por 48 h (HOAGLAND; WILLIAMS, 2004).

Ao final do experimento, as imagens das placas, para cada tratamento, foram capturadas com um scanner (Epson Expression 800, Regent Instruments, Ville de Québec, Canadá). O comprimento total da raiz (CTR) foi obtido utilizando uma régua e uma curva dose-resposta foi obtida. As concentrações de cumarina que causam 50% (IC₅₀) e 80% (IC₈₀) da inibição do crescimento radicular foram obtidas através do programa GraphPad 7.3.

2.2 Experimentos em plantas adultas

Sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes (Califórnia) foram semeadas em bandejas plásticas e alvéolos com seis lóculos contendo perlita. Em seguida, foram colocadas em uma câmara de crescimento (fotoperíodo 16/8 h a 150 µmol m⁻² s⁻¹ e 18/8 °C) e irrigadas com 500 mL de solução nutritiva Hoagland (pH 6,0), contendo a cumarina diluída em 500µL

de EtOH, a cada 48 h, durante quatro semanas. As concentrações de cumarina foram determinadas de acordo com a curva dose-resposta para o crescimento radicular, em: controle 0 μM (controle), $\text{IC}_{50} = 53 \mu\text{M}$ e $\text{IC}_{80} = 85 \mu\text{M}$. No controle foi adicionado apenas EtOH (P.A.).

2.3 Fluorescência da clorofila *a*

Para avaliar a emissão da fluorescência da clorofila *a*, seis plantas adultas de *L. sativa* (quatro semanas de idade) por tratamento, submetidas às soluções de concentrações 53 μM (IC_{50}) e 85 μM (IC_{80}) da cumarina, foram monitoradas utilizando as imagens do sistema (Imaging-PAM M-Series, Walz, Effeltrich, Alemanha). As plantas foram mantidas no escuro por 30 minutos para que todos os centros de reação adquirissem a condição de "abertos" (extintor fotoquímico não-reduzido) e reduzir fluorescência associado com a energização da membrana do tilacoide (KRAUSE et al., 1982).

As folhas foram iluminadas a $0,5 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para obtenção do F_0 , a mínima emissão de fluorescência emitida por folhas adaptadas ao escuro. Em seguida foram saturadas com um pulso de $2700 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para mensurar F_m , a máxima fluorescência emitida por folhas adaptadas ao escuro. Após 5 minutos de iluminação actínica a $120 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (para medir a fluorescência correspondente a F_s), as amostras receberam 20 s de pulsos saturantes de 800 a $200 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para obter os valores de F_m' , a máxima fluorescência de folhas adaptadas à luz.

Estes valores foram utilizados para calcular os parâmetros utilizados para comparações entre os tratamentos (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008; KRAMER et al., 2004): eficiência quântica máxima do fotossistema II adaptados ao escuro (F_v/F_m); eficiência quântica máxima do fotossistema II iluminado (Φ_{II}); dissipação de energia sob a forma de calor (Φ_{NPQ}); dissipação de energia não modulada (Φ_{NO}) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). A resposta fotossintética foi monitorada durante 5 minutos e foram obtidas quinze medidas para cada parâmetro.

2.4 Pigmentos fotossintéticos

Para determinar o teor total de clorofila e carotenoides (xantofilas e carotenos), 0,5 g de material vegetal foram macerados com nitrogênio líquido e metanol, e centrifugados a 4000 r.p.m a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. 2 mL do extrato metanólico foi coletado e acrescentado 6 mL de metanol (P.A.), em seguida medido a absorbância a 470, 653, 666 e 750 nm em espectrofotômetro, quatro replicadas independentes por tratamento foram analisadas. A concentração dos pigmentos foi calculada de acordo com Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a = (15,65 \cdot (\text{DO}_{666} - \text{DO}_{750}) - 7,34 \cdot (\text{DO}_{653} - \text{DO}_{750})) \cdot V$$

$$\text{Clorofila } b = (27,05 \cdot (\text{DO}_{653} - \text{DO}_{750}) - 11,21 \cdot (\text{DO}_{666} - \text{DO}_{750})) \cdot V$$

$$\text{Carotenoides (X+C)} = (1000 \cdot (\text{DO}_{470} - \text{DO}_{750}) - 2,86 \cdot \text{Clorofila } a - 129,2 \cdot \text{Clorofila } b) / 221 \cdot V$$

$$\text{Carotenoides (X+C)} = \text{Xantofilas} + \text{Carotenos}$$

DO = densidade ótica

V = volume de metanol utilizado

2.5 Proteínas solúveis totais (P.T.)

O teor de proteínas foi determinado de acordo com o método Bradford (BRADFORD, 1976). Cinco repetições por tratamento, utilizando 100 mg de material vegetal homogeneizados com nitrogênio líquido. Utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA; Sigma-Aldrich®), como padrão. Quatro replicações independentes foram analisadas por tratamento.

2.6 Prolina livre

A determinação do conteúdo de prolina livre foi realizada de acordo com a metodologia de Bates et al. (1973). Foram tomadas precauções especiais para selecionar as folhas no mesmo estágio de desenvolvimento, de até cinco plantas diferentes em cada tratamento. Para obtenção do extrato, após quatro semanas de crescimento, 200 mg de material vegetal foram homogeneizados em nitrogênio líquido, extraídos com 5 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v) e filtrado em papel Whatman N^o 2. Após filtragem, retirou-se 2,5 mL do extrato e acrescentou-se 2 mL de ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona) e 2 mL de ácido acético glacial e aquecido em banho-maria durante 1 h a 100 °C. A reação foi interrompida utilizando banho gelo. Para a formação do cromóforo, foi adicionado 4 mL de tolueno, ocorrendo a formação de duas fases. Retirou-se a fase orgânica para realizar a leitura da absorbância em 520 nm, utilizando tolueno como branco. O teor de prolina foi determinado a partir de uma curva padrão e expresso em $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco.

2.7 Potencial hídrico e osmótico (Ψ_w e Ψ_s)

Cinco folhas totalmente expandidas, por tratamento, foram utilizadas para determinar o Ψ_w , utilizando a câmara de pressão de Scholander (SCHOLANDER et al., 1965). Para

avaliar o Ψ_s as folhas foram colocadas em seringas de 60 mL e levadas ao freezer (-20 °C) por 48 h. Em seguida o líquido obtido da folha foi levado ao osmômetro Loser Type 6 (Loser, Berlim, Alemanha).

2.8 Peso seco (Ps), peso fresco (Pf), relação Ps/Pf e conteúdo relativo de água (CRA)

Cinco plantas completas por tratamento, com quatro semanas de idade, foram coletadas e pesadas obtendo-se o peso fresco e o peso seco foi obtido após secagem, durante três dias a 60 °C. Para CRA, foram retirados quatro discos foliares de 0,5cm² de quatro plantas diferentes, por tratamento, com folhas no mesmo estágio de desenvolvimento. Em seguida, os discos foram pesados, para obtenção do peso fresco, e colocados em água destilada a 4 °C por 4 h, para obtenção do peso turgido. Logo após, os discos foram secos em estufa a 70 °C por 48 h e depois pesados. O CRA foi determinado com base na seguinte equação:

$$\% \text{ CRA} = [(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / (\text{peso turgido} - \text{peso seco})] \cdot 100$$

2.9 Condutância estomática (g_s) e transpiração (E)

As medidas de condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e taxa de transpiração ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram feitas em cinco plantas diferentes por tratamento, com um porômetro portátil modelo Li-1600 (LI-COR, Inc, Lincoln, NE, USA). As medidas foram efetuadas em folhas totalmente desenvolvidas, com quatro semanas de idade, dispostas em posições semelhantes em relação à planta e à incidência da luz artificial.

2.10 Análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado em todos os experimentos, com cinco repetições para os experimentos de germinação e crescimento radicular, e quatro para pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais, e os demais experimentos cinco repetições, para cada tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (W) e quanto à homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene. A análise de variância entre as médias dos tratamentos foi estimada pela ANOVA (*one-way*), seguida do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

A curva dose-resposta (FIGURA 1) da germinação e do crescimento da radícula em resposta as doses crescentes da cumarina (1,2 benzopirona) aponta uma forte fitotoxicidade desta molécula. Em 150 μ M da cumarina ocorrem reduções de 100% da germinação e 65% do crescimento radicular, se comparado ao controle. Em relação à dinâmica sobre os índices de germinação (TABELA 1) como a velocidade de germinação (S), a germinação acumulada (AS) foi sensível a cumarina até mesmo nas menores concentrações, com decréscimo de 43 e 48% na concentração de 25 μ M, 77 e 82% em 50 μ M, atingindo valores nulos em 150 e 300 μ M.

O crescimento da radícula (comprimento total da raiz, CTR) foi menos sensível a cumarina do que a germinação, uma vez que se observa o crescimento de 18% da raiz em 300 μ M, relação ao controle, enquanto a germinação foi nula na mesma concentração (FIGURA 2). Entretanto, a redução do crescimento da radícula foi dose-dependente.

Figura 1-Curva dose-reposta da germinação e crescimento inicial da raiz de *L. sativa* (em relação ao controle) submetidas a concentrações crescentes de cumarina (0, 25, 50, 75, 150 e 300 μ M).

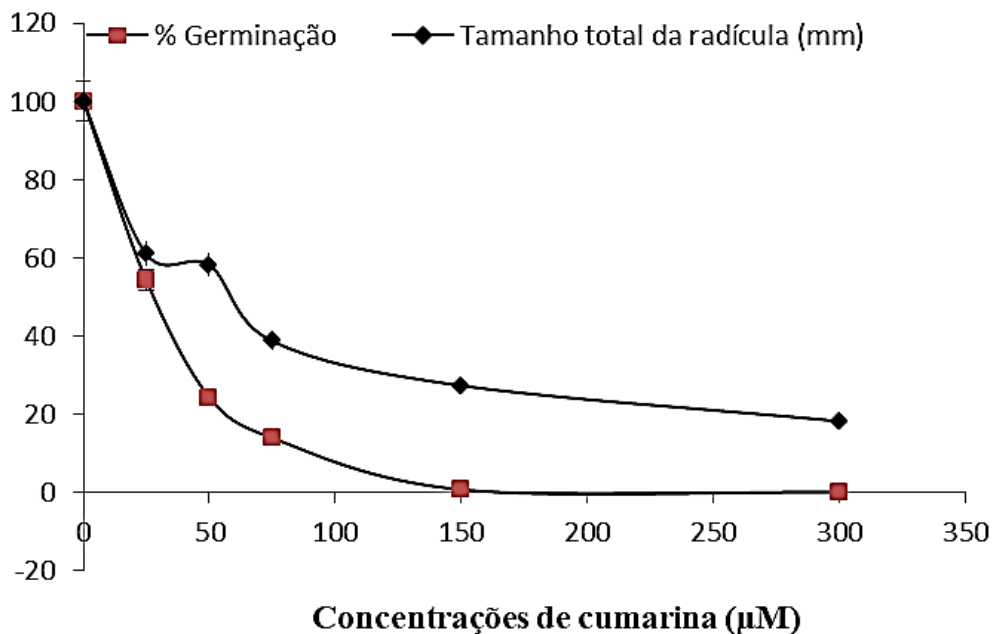
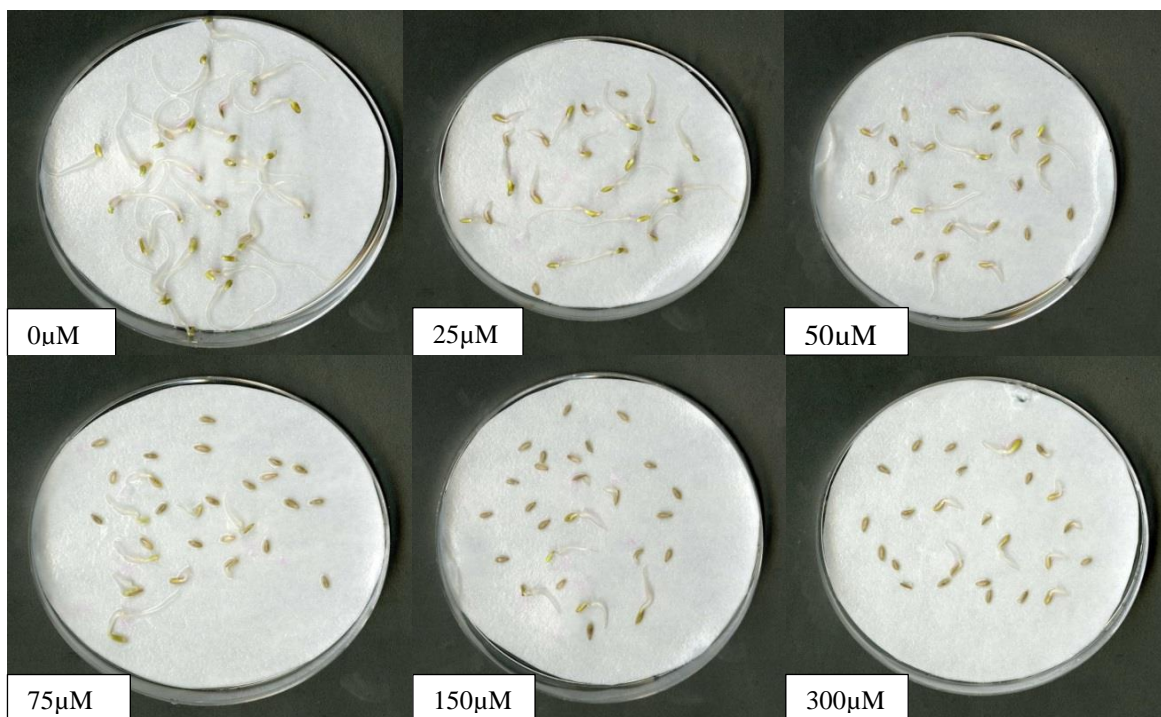


Tabela 1- Germinação total [GT (%)], Velocidade média da germinação (S), Velocidade de germinação acumulada (AS) e Comprimento total da raiz (CTR) de *L. sativa* submetidas a concentrações de cumarina (0-300 μ M).

	G_T (%)	S	AS	CTR
0 μ M	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
25 μ M	57,78 ^b	57,51 ^b	52,4 ^b	59,4 ^b
50 μ M	21,22 ^c	22,26 ^c	17,32 ^c	57,8 ^b
75 μ M	15,30 ^c	10,1 ^d	12,36 ^c	34,4 ^c
150 μ M	0,86 ^d	0,26 ^d	0,5 ^d	26,9 ^d
300 μ M	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	18,1 ^e
C.V.(%)	13	21	15	4

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$ (teste Tukey). $N = 5$.

Figura 2- Imagens das placas demonstrando o crescimento radicular da *L. sativa* submetida a concentrações crescentes de cumarina (0 - 300 μ M).



Fonte: Do autor (2018).

Em plantas da *L. sativa*, com quatro semanas, observou-se um efeito altamente significativo no peso fresco (Pf) das plantas, com decréscimo de 40% (53 μ M) e 72% (85 μ M), em comparação ao controle (TABELA 2). Já o peso seco (Ps), a relação peso e fresco

(Pf/Ps), o conteúdo relativo de água (CRA) e potencial osmótico (Ψ_s) não foram afetados significativamente. O potencial hídrico (Ψ_w) das plantas da *L. sativa* aumentou em 55% seu valor ao utilizar o IC₅₀ e 34% no IC₈₀, quando relacionado aos valores do controle.

Em se tratando da condutância estomática (g_s) ocorreram reduções da ordem de 42% (IC₅₀) e 38% (IC₈₀) em folhas da *L. sativa* e a transpiração (E) foram afetadas aproximadamente 36% em ambas as concentrações de cumarina utilizadas (TABELA 2). O teor de prolina livre aumentou significativamente em todas as concentrações testadas (IC₅₀ = 44 e IC₈₀ = 23%) (TABELA 2) e o conteúdo de proteína solúveis totais (P.T.) das folhas tiveram um leve aumento de 8% no IC₅₀ e redução de 24% no IC₈₀ (TABELA 3).

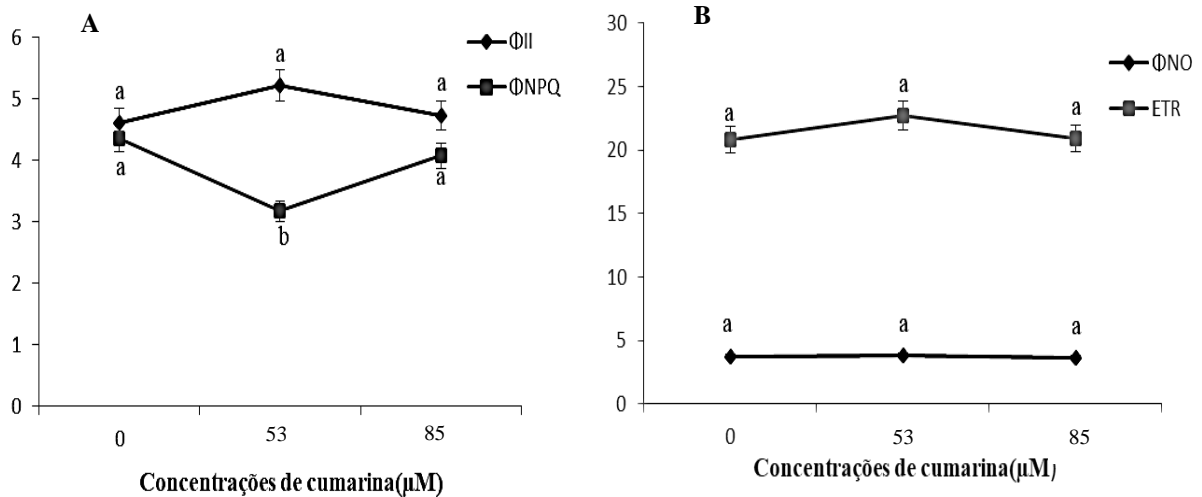
Tabela 2-Peso fresco [Pf (g)], Peso seco [Ps (g)], Relação Ps/Pf, conteúdo relativo de água [CRA(mm)], Potencial hídrico (-) (Ψ_w ; Mpa), Potencial osmótico (Ψ_s ; Mpa) Condutância estomática (g_s ; mmol m⁻² s⁻¹), Transpiração (E; $\mu\text{g cm}^{-2}$ s⁻¹), Prolina livre ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$.gps), proteínas solúveis totais (P.T.; $\mu\text{g. g}_{\text{PS}}^{-1}$) plantas adultas de *L. sativa* irrigadas com cumarina [1,2- benzopirona], 0 μM (controle), 53 μM (IC₅₀) e 85 μM (IC₈₀) durante quatro semanas. Os dados estão em porcentagem em relação ao controle.

Concentração	Pf	Os	Ps/Pf	CRA	Ψ_w (-)	Ψ_s	g_s	E	Prolina	P.T.
0 μM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Estatística</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
IC₅₀ (53 μM)	60	63	98	100,1	155	104	58	64	144	108
<i>Estatística</i>	b(**)	a	a	a	b(**)	a	b(*)	b(**)	b(*)	a
IC₈₀ (85 μM)	28	72	135	101,3	134	102	62	68	123	76
<i>Estatística</i>	c(**)	a	a	a	b(**)	a	b(*)	b(**)	b(*)	b(**)

Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na coluna, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**) (teste Tukey), P.T. (Proteínas totais) $N = 4$, demais testes $N = 5$.

Em relação à fluorescência da clorofila *a*, a cumarina afetou significativamente a remoção não fotoquímica (Φ_{NPQ}) em *L. sativa* (FIGURA 3A). Entretanto, os outros parâmetros como extinção fotoquímica (Φ_{II}) (FIGURA 3A), emissão da fluorescência (Φ_{NO}) (FIGURA 3B) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas tratadas com as concentrações de 53 μM e 85 μM , durante quatro semanas, não foram afetadas significativamente (FIGURA 3). Imagens das plantas sob a eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) (FIGURA 4). Em se tratando dos pigmentos fotossintéticos (FIGURA 5), a concentração de cumarina 85 μM (IC₈₀) promoveu redução no teor de carotenoides (62 %) em plantas de *L. sativa*, em relação ao controle.

Figura 3-Valores da eficiência quântica efetiva no FSII (Φ_{II}) (A); Rendimento quântico da extinção não -fotoquímica induzida por luz (Φ_{NPQ}) (A); Emissão da fluorescência (Φ_{NO}) (B) e a Taxa de transporte de elétrons (ETR) (B), em plantas de *L. sativa* após tratamento com cumarina (1,2- benzopirona), 0 μ M (controle), 53 μ M (IC₅₀) e 85 μ M (IC₈₀). As plantas inteiras foram medidas quanto à fluorescência e os valores foram integrados posteriormente. Quinze medidas foram obtidas para cada parâmetro em cada tempo de medição, o que proporcionou um gráfico cinético para cada parâmetro ao longo do tempo.



Legenda: Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) e ao teste de Levene para a heteroscedasticidade. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos, pelo teste Tukey a 5%, $N = 6$.

Figura 4-Imagens das plantas sob a eficiência quântica máxima do fotossistema II adaptados ao escuro (F_v/F_m) das folhas plantas da *L. sativa* tratadas com cumarina (1,2- benzopirona), 0 μ M (controle), 53 μ M (IC₅₀) e 85 μ M (IC₈₀). Imagens obtidas do Imaging-PAM M-Series. F_v =fluorescência variável. F_m =fluorescência máxima. F_v/F_m =razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima.

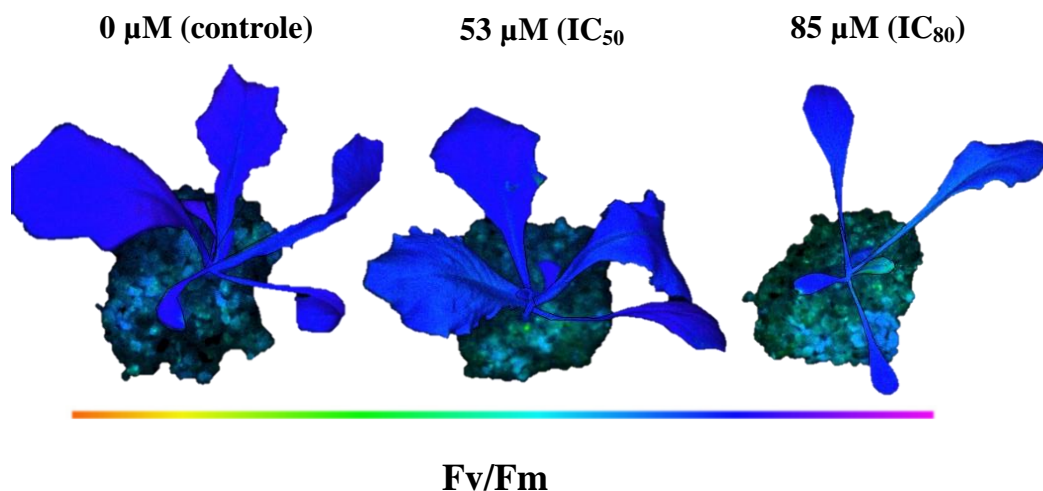
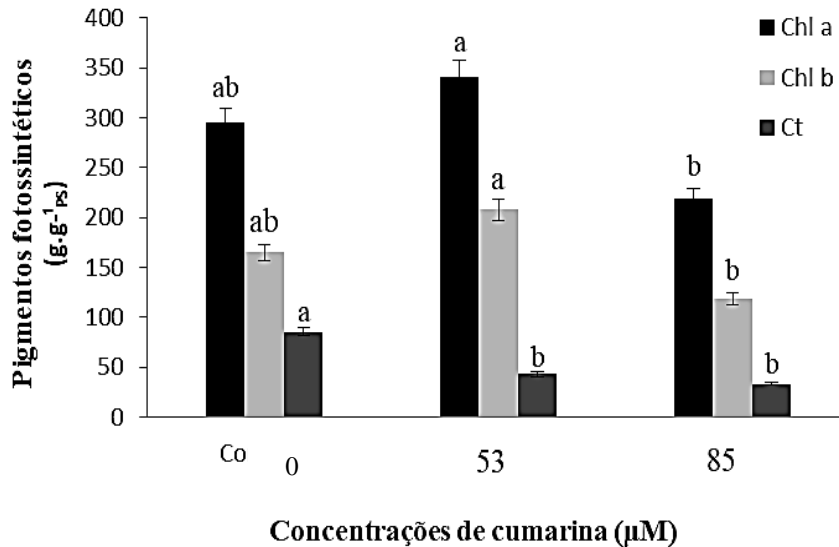


Figura 5-Conteúdo de pigmentos fotossintéticos ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$) em plantas de *L. sativa* com quatro semanas tratadas com $53\mu\text{M}$ (IC50) e $85\mu\text{M}$ (IC80) de cumarina (1,2 – benzopirona). Clorofila a (Chla), Clorofila b (Chlb), Carotenoides (Cat).



Legenda: Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PS = peso seco. $N = 4$.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho as concentrações utilizadas da cumarina inibiram a germinação das sementes, bem como todos os índices testados (S e AS) e o crescimento das plântulas, particularmente o crescimento da raiz. A cumarina é considerada uma molécula que altera fortemente o crescimento das raízes em plântulas da *L. sativa* (PERGO et al., 2008; RAZAVI, 2011; WU et al., 2016), principalmente por atuar como agente citostático.

A cumarina é uma molécula simples que apresenta diversas atividades biológicas como inibir a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, por meio de diversos efeitos fisiológicos (EINHELLIG et al., 2004; LI et al., 2010). Apesar do amplo envolvimento nos processos bioquímicos e fisiológicos (ABENAVOLI et al., 2008) o modo de ação da cumarina em plantas é considerado pouco elucidado (ARANITI et al., 2017).

Plantas de *L. sativa* tratadas com a cumarina, durante quatro semanas, demonstraram reduções no peso fresco das plantas e aumento no potencial hídrico. Segundo Hara et al. (1973) a cumarina impede à incorporação de glicose as microfibrilas de celulose da parede celular, reduzindo o peso fresco em plantas. Entretanto, os resultados obtidos no presente

estudo vão de encontro ao descrito por Araniti et al. (2017), ao utilizar a 1,2-benzopirona em plantas adultas de *A. thaliana*.

A condutância estomática e a transpiração foram reduzidas, alterações que podem afetar a assimilação de CO₂ (HABERMANN, 2017), é amplamente relatado que os compostos fenólicos, como ácido ferúlico (10⁻³ M) e ácido gálico (10⁻³M) atuam sobre o hormônio ABA diminuindo a condutância estomática e a transpiração em plantas, podendo causar reduções na taxa fotossintética líquida (PATTERSON, 1981; RAI, 2003), algo que pode ter ocorrido com as plantas de *L. sativa*.

A tendência ao acúmulo de prolina livre e a redução do teor de proteínas solúveis totais refletem o possível estresse nas plantas da *L. sativa* tratadas com a cumarina. A função do aumento no teor de prolina livre em plantas crescidas sob estresse é amplamente discutida (ALVARENGA et al., 2011; HARUN; JOHNSON; ROBINSON, 2015; MARUR et al., 1994; 1998). É provável que os aminoácidos livres, como a prolina, atuem como regulador do potencial osmótico, como observado no presente estudo, em que os valores não foram alterados e a redução na concentração de proteínas totais poderia refletir na diminuição da síntese ou aumento da degradação, elevando os níveis de aminoácidos livres (MARUR et al., 1994).

Segundo Madan et al. (1995), citado por Carvalho et al. (2005), o aumento do teor de prolina pode refletir à maior atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina (ornitina aminotransferase e pirrolina-5-carboxilase redutase), ou inibição da enzima de degradação, a prolina oxidase. Todavia, as respostas variam de acordo com a espécie, tecido e idade, bem como da duração e intensidade do estresse (GAN; AMASINO, 1997; MARUR et al., 1994).

A fluorescência da clorofila *a* é considerada uma ferramenta útil no monitoramento do status fisiológico de plantas sob estresse (KALAJI et al., 2016). Este parâmetro estima a eficiência com que a energia luminosa absorvida pelas clorofilas associadas ao PSII é usada na fase fotoquímica em determinada intensidade luminosa. É determinado pelo produto da fração dos centros de reação abertos pela eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos. Ambas são medidas de claro.

A FSII (Φ_{II}) pode ser considerada como a eficiência quântica do transporte linear de elétrons através do FSII, em uma dada intensidade luminosa (BAKER; ROSENQVIST, 2004). A habilidade do aparato fotossintético em remover elétrons das quinonas (Q_A), primeiras moléculas aceptoras estáveis de elétrons (WALKER, 1992), é um fator limitante de Φ_{FSII} . Portanto, baixos valores de Φ_{PSII} refletem um acúmulo de Q_A em estado reduzido.

Desta forma, os resultados (Figura 3A) demonstraram que a taxa aparente de transporte de elétrons não foram alterados. Sendo possível observar a manutenção na eficiência quântica efetiva do FSII, bem como nos valores de ETR.

Quanto ao rendimento quântico da extinção não - fotoquímica induzida por luz (Φ_{NPQ}) foi reduzido no IC₅₀ e retornou ao seu patamar normal (valores próximos ao controle) no IC₈₀. Alterações nesse parâmetro sinalizam um possível estresse no aparelho fotossintético. Entretanto, os demais parâmetros avaliados não sofreram alterações indo de encontro ao observado por Araniti et al., (2017) em *Arabidopsis thaliana* cultivadas com 1,2-benzopirona. O teor de carotenoides (xantofila + carotenos) foi reduzido pela cumarina (IC₈₀), esses pigmentos acessórios são responsáveis pela redução da fotoinibição no aparato fotossintético (ARANITI et al., 2017; HAVAUX; KLOPPSTECH, 2001).

É possível que as plantas da *L. sativa*, com quatro semanas de cultivo, tenham fotoaclimatado, como as plantas da *A. thaliana* mutantes (*npq1*) nas enzimas funcionais do ciclo xantofílico, a violaxantina *de*-epoxidase. As enzimas são responsáveis pela produção da xantofila, um importante pigmento acessório, junto com os carotenos. Essas plantas foram submetidas a baixas temperaturas (10 °C) e elevado fluxo de fótons (10-12 dias). Em reposta, as plantas produziram outros pigmentos como os flavonoides para proteger os fotossistemas (HAVAUX; KLOPPSTECH, 2001).

5 CONCLUSÕES

Cumarina afetou negativamente a germinação e o crescimento radicular. Também interferiu no funcionamento bioquímico e fisiológico das plantas adultas. Principalmente, peso fresco, respiração, conteúdos de prolina e proteínas totais. Não afetou a fluorescência da clorofila *a* e os teores de pigmentos fotossintéticos. Esses resultados contribuem para elucidação da atuação dessa substância em *L. sativa* e propor aplicações futuras em plantas invasoras de áreas cultivadas e a possível utilização como bioherbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAVOLI, M.R.; SANTIS, C. DE; SIDARI, M.; SORGONÀ, A.; BDIANI, M.; CACCO, G. **Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat.** *New Phytol.* v.150, n.3, p.619-627, 2001.

ABENAVOLI, M.R.; CACCO, G.; SORGONÀ, A.; MARABOTTINI, R.; PAOLACCI, A.R.; CIAFFI, M.; BDIANI, M. **The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidums* sp. *durum*, CV. Simeto) seeds.** *J. Chem. Ecol.* v.32, n.2, p.489-506, 2006.

ABENAVOLI, M.R.; NICOLÒ, A.; LUPINI, A.; OLIVA, S.; SORGONÀ, A. **Effects of different allelochemicals on root morphology of *Arabidopsis thaliana*.** *Allelopathy J.* v.22, n.1, p.245-250, 2008.

ALVARENGA, I.C.A.; QUEIROZ, G.A.; HONÓRIO, I.C.G.; VALADARES, R.V.; MARTINS, E. R. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.13, n.201, p.539-541, 2011.

ARANITI, F.; MANCUSO, R.; LUPINI, A.; GIOFRÈ, S.V.; SUNSERI, F.; GABRIELE, B.; ABENAVOLI, M.R. Phytotoxic Potential and Biological Activity of Three Synthetic Coumarin Derivatives as New Natural-Like Herbicides. **Molecules.** v.20, n.10, p.17883-17902, 2015.

ARANITI, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; CHAMBERY, A.; RUSSO, R.; ESPOSITO, A.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; LUPINI, A.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Highlighting the effects of coumarin on adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by an integrated-omic approach. **Journal of Plant Physiology.** v.213, p.30-41, 2017.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil.** v.39, p.205-207, 1973.

BAKER, N.R., ROSENQVIST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany.** v.55, p.1607-1621, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v.72, p.248-254, 1976.

CARVALHO, L.M.; CASALI, V.W.D.; SOUZA, M. A., BARBOSA, L.C.A; CECON, P.R. Crescimento, teor de partenólídeo e de prolina em plantas de *tanacetum parthenium* Schultz-

Bip crescidas em substrato com diferentes teores de umidade. *Acta Scientiarum Agronomy*. v.27, n.1, p.151-157, 2005.

CHIAPUSIO G.; SANCHEZ A.M.; REIGOSA M.J.; GONZALEZ L.; PELLISSIER, F. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process, **Journal of Chemical Ecology**. v.23, p.2445– 2453,1997.

DUMAS, E.; GIRAUDO, M.; GOUJONE, E.; HALMAA, M.; KNHILI, E.; STAUFFERT, M.; BATHISSON, I.; BESSE-HOGGANA, P.; BOHATIER, J.; BOUCHARDC, P.; CELLE-JEANTONG, H.; COSTA GOMES, M.; DELBAC, F.; FORANO, C.; GOUPIL, P.; GUIXI, N.; HUSSONA, O.; LEDOIGT, G.; MALLET, C.; MOUSTYA, C.; PRÉVOT, V.; RICHARDA, C.; SARRAUTEA, C. Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: An overview to assess the environmental risks. *Journal of Hazardous Materials*. v.325, p.136–156, 2017.

EINHELLIG, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: Macias, F.A.; Galindo, J.G.C.; Molinillo, J.M.G.; Gutler, H.G. (eds.) *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. p.217–238, 2004.

GAN, S.; AMASINO, R.M. Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence. **Plant Physiol**. v.113, n.2, p.313-319, 1997.

GRAÑA, E.; COSTAS-GILA, A.; LONGUEIRA, S.; CELEIROB, M.; TEIJEIRAB, M.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRA, A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on Arabidopsis cell structure and morphology. **Journal of Plant Physiology**. v.218, p.45–55, 2017.

HOAGLAND, R.E.; WILLIAMS, R.D. Bioassay - useful tool for the study of allelopathy. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. (Eds), *Allelopathy*. Chemistry and mode of action of allelochemicals. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p.315– 351, 2004.

HARA, M., UMETSU, N., MIYAMOTO, C.H., TAMARI, K. Inhibition of the biosynthesis of plant cell wall materials, especially cellulose biosynthesis by coumarin. **Plant Cell Physiol**. v.14, p.11-28, 1973.

HARUN, M.A.Y.A.; JOHNSON, J.; ROBINSON, R.W. The contribution of volatilization and exudation to the of invasive *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *monilifera* (boneseed) **Biol. Invasions**, v.17, p.3609, 2015.

HAVAUX, M. & KLOPPSTECH, K. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt*mutants. **Planta**. v.213, n.6, p.953-66, 2001.

HABERMANN, E.; PEREIRA, V.C.; IMATOMI, M.; PONTES, F.C.; GUALTIERI, S.C.J. In vitro herbicide activity of crude and fractionated leaf extracts of *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae). **Braz. J. Bot.** v.40, n.1, p.33-40, 2017.

KAI, K.; SHIMIZU, B.; MIZUTANI, M.; WATANABE, K.; SAKATA, K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**. v.67, n.4, p.379–386, 2006.

KALAJI, H.M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, A.; CETNER, M.D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R.J. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiol Plant.** v.38, p.102, 2016.

KRAMER, D.M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O.; EDWARDS, G.E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox states and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research.** v.79, p.209–218, 2004.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. **PAM Application Notes.** v.1, p.27–35, 2008.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. **Photosynth. Res.** v.5, n.2, p.139–157, 1984.

LUPINI, A.; ARANITI, F.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. Coumarin interacts with Auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regul.** v.74, n.1, p.23–31, 2014.

LI, Z.H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.D.; JIANG, D.A. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules.** v.15, n.12, p.8933-8952, 2010.

MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHES, A.C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** v.6, n.2, p.103-108, 1994.

MADAN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K.; CHOWDHURY, J. B. Proline and proline metabolising enzymes in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Ann. Bot.** v.76, n.1, p.51-57, 1995.

NEBO, L.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochem Lett.** v.8, p.226–232, 2014.

PATTERSON, D.T. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). **Weed Sci.** v.29, p.53-59, 1981.

PERGO, É.M.; ABRAHIM, D.; DA SILVA, P.C.S.; KERN, K.A.; DA SILVA, L.J.; VOLL, E.; ISHII-IWAMOTO, E.L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **J. Chem. Ecol.** v.34, n.4, p.499–507, 2008.

RAI, V.; GUPTA, S.; SINGH, B. Volatile Monoterpenes from *Prinsepia utilis* L. Leaves Inhibit Stomatal Opening in *Vicia faba* L. **Biologia Plantarum.** v.46, n.121. 2003.

RAZAVI, S.M. Plant coumarins as allelopathic agents. **Int J. Biol Chem.** v.5, p.86–90, 2011.

WALKER, D.A. Excited leaves. **New Phytologist.** v.121, p.325–345, 1992.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophyll total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology.** v.144, p.307–313, 1994.

WU, C.X.; ZHAO, G.Q.; LIU, D.L.; LIU, S.J.; GUN, X.X.; TANG, Q. Discovery and weed inhibition effects of coumarin as the predominant allelochemical of yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). **Int. J. Agric. Biol.** v.18, p.168–175, 2016.

YAN, Z.; WANG, D.; CUI, H. et al. Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. **Acta Physiol Plant.** v.38, p.248, 2016.

ZOBEL, A.M.; BROWN, S. A. Coumarins in the interactions between the plant and its environment. **Allelopathy Journal.** v.2, n.1, p.9–20, 1995.

ARTIGO 4- ALTERAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS NA RAIZ DE *Arabidopsis thaliana* CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO À CUMARINA

RESUMO - A cumarina altera a morfologia das raízes de várias espécies receptoras em ambientes naturais ou controlados. Objetivou-se identificar o efeito cumulativo da cumarina sobre a morfo-anatômica da raiz de *Arabidopsis thaliana* longo do tempo (7 e 14 dias). Para isso foram empregados experimentos utilizando sementes cultivadas em placas de Petri quadradas contendo ágar e a cumarina (0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 μM), diluída previamente em etanol, como controle foi utilizado apenas etanol acrescido ao ágar. Após determinar o IC_{50} foram realizados cortes dos ápices radiculares, em períodos distintos, 7 e 14 dias de cultivo (seções longitudinais de 0,7 μm). Em seguida os cortes foram corados com azul de toluidina. O IC_{50} foi de 14 μM , causando malformação nos ápices das raízes, principalmente aos 14 dias de cultivo. Observou-se também aumento do número de raízes laterais e de pelos radiculares; surgimento de raízes ectópicas; células e núcleos assimétricos.

Palavras chave: Aleloquímico. *Arabidopsis*. Curva dose-reposta. Sistema radicular.

ABSTRACT - Coumarin alters the morphology of the roots of several recipient species in natural or controlled environments. The aim of this study was to identify the cumulative effect of coumarin on morpho-anatomy of *Arabidopsis thaliana* root (7 and 14 days) over time. For this, experiments using seeds cultivated in square Petri dishes, containing agar and coumarin (0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 and 24 μM), previously diluted in ethanol. As control was used only ethanol added to agar. After determining the IC_{50} , the root apices were cut at different periods, 7 and 14 days of cultivation (longitudinal sections of 0.7 μm). The sections were then stained with toluidine blue. The IC_{50} was 14 μM , causing malformation on the root apices, mainly at 14 days of culture. It was also observed an increase in the number of lateral roots and root hairs; emergence of ectopic roots; cells and nuclei asymmetrical.

Keywords: Allelochemical. *Arabidopsis*. Dose-response curve. Root system

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 1.300 cumarinas como metabólitos secundários, foram identificadas em plantas, bactérias e fungos (GRESSEL, 2011). Esse grupo de substâncias é conhecido pelas propriedades farmacológicas tais como anti-inflamatório, anticoagulante e anti-cancer (CZELUSNIAK et al., 2012; SBAI et al., 2017) e pela atividade fitotóxica desempenhada em ambientes naturais e controlados (ABENAVOLI et al., 2006; CHON; KIM, 2004; NAZEMI et al., 2015; PERGO et al., 2008).

A resposta das plantas receptoras em relação à cumarina é específica, depende da concentração e do tempo de contato (BENNETTE et al., 2004). Por exemplo, o crescimento do arroz, feijão, alface, trevo e trigo foram inibidos na faixa de concentração entre 10-100 ppm da cumarina (MONACO et al., 2002). Além disso, essa biomolécula afeta a respiração e a fotossíntese, por meio da inibição do transporte de elétrons em plantas da espécie *Arabidopsis thaliana* (KUPIDŁOWSKA et al., 1994; MORELAND; NOVITZKY, 1987).

Outra atividade relacionada à cumarina é a interferência no metabolismo do nitrogênio em células de cenoura (ABENAVOLI; FUGGI, 1995), o impedindo da germinação (WU et al., 2016) e da divisão celular (YUKSEL et al., 2017). A rizogênese também é comprometida na presença da cumarina, bem como a estrutura dos cromossomos em *Allium* sp. (KRAEHMER et al., 2014). A cumarina também induz o surgimento de aberrações em várias fases da mitose (YUKSEL et al., 2017) e estimular o surgimento de anormalidades nas células e tecidos das raízes (GRAÑA et al., 2017).

A cumarina (1,2-benzopirona), como o composto mais simples da classe, é capaz de promover a expansão radial de células do meristema da raiz, atuando na desorganização do citoesqueleto e induzindo a malformação das células em *A. thaliana*, na concentração de 500 μ M durante 72 h (KUPIDŁOWSKA, 2001). Já Abenavoli et al. (2008) observaram somente em um momento, após 12 dias de cultivo utilizando 324 μ M da cumarina.

No entanto, apesar dessas evidências, não foram realizados estudos sobre a influência da cumarina na morfologia da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* ao longo do tempo. Desse modo, objetivou-se avaliar o efeito cumulativo (7 e 14 dias) da cumarina sobre a morfo-anatômica da raiz de *Arabidopsis thaliana*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Lehle Seeds, Texas USA), ecotipo Columbia (Col-0), foram esterilizadas em 50% de EtOH (3 min) e 0,5% de NaOH (3 min). Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram incorporadas em ágar 0,1%, e armazenadas á 4 °C durante 72 h para sincronizar a germinação das sementes. Após as sementes foram transferidas para placas de Petri quadradas (150 x 150 mm) contendo ágar 0,8% (p/v), 0,44% de macro e micronutrientes (p/v; Murashige-Skoog, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 1% de sacarose; pH 6,0. Após o semeio as placas foram colocadas verticalmente em uma câmara de crescimento a 22 ± 2 °C e 55% de umidade relativa. A cumarina (1,2-benzopirona; 99%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi preparado em 100µL de etanol P.A. (Sigma-Aldrich) e diluída no ágar para obter as concentrações testadas.

2.2 Curvas de dose-resposta e aquisição de imagem

O meio de cultura suplementado com cumarina (0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 µM) foi utilizado objetivando acompanhar o processo germinativo e o crescimento inicial da raiz, bem como os fenótipos após a exposição a cumarina. Foram utilizados cinco repetições por concentração com 24 sementes, cada. As plântulas foram cultivadas em fotoperíodo de 8 h ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A taxa de germinação total [$GT_{(\%)}$], a velocidade média de germinação (S) e a velocidade de germinação acumulada (AS) foram calculadas de acordo com a metodologia de Chiapusio et al. (1997). A curva dose-resposta do comprimento da raiz foi determinada após 14 dias da semeadura. Esse parâmetro também foi utilizado para deteminar o IC_{50} da raiz (concentração de cumarina em µM necessária para reduzir 50 % do crescimento), por meio do programa GraphPad 7.3.

Após o período de cultivo (7 e 14 dias), na presença ($IC_{50} - 14 \mu\text{M}$) e ausência (0 µM) da cumarina, as raízes da *A. thaliana* foram analisadas e fotografadas, utilizando um Microscópio Nikon Eclipse 800, equipado com uma câmera digital Nikon DS-U2 e um amplificador eletrônico Nikon SMZ 1500 (Melville, NY, EUA) (Nikon, Japão).

2.3 Análise da estrutura das raízes da *Arabidopsis thaliana*

Os ápices das raízes de *A. thaliana*, cultivadas durante 7 e 14 dias na presença de 0 μM e do IC_{50} da cumarina, foram cortadas e imediatamente colocadas em 0,5% de glutaraldeído preparado em tampão de cacodilato a 0,1 M e pH 7,2, e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Após três lavagens, em tampão de cacodilato (Buffer), os ápices foram transferidos para 2% de tetróxido de ósmio (OsO_4), também preparado em tampão de cacodilato a 0,1 M e pH 7,2, incubado durante 3 h. Em seguida, foram transferidos e mantidos em solução a 10% de acetona com 2% de acetato de uranilo por 1 h. Após esse tempo, amostras foram desidratados em concentrações crescentes de acetona: 50% (2×30 min), 75% (2×1 h), 80% (2×1 h), 95% (2×1 h) e 100% (2×2 h); e depois incorporado na resina de Spurr (DÍAZ-TIELAS et al., 2012).

As seções longitudinais com espessura de 0,7 μm foram coradas com azul de toluidina e observadas em Microscópio de luz Eclipse 800, equipado com uma câmera digital Nikon DS-U2 com o software NIS-Elements D2'30 SP1.

3 RESULTADOS

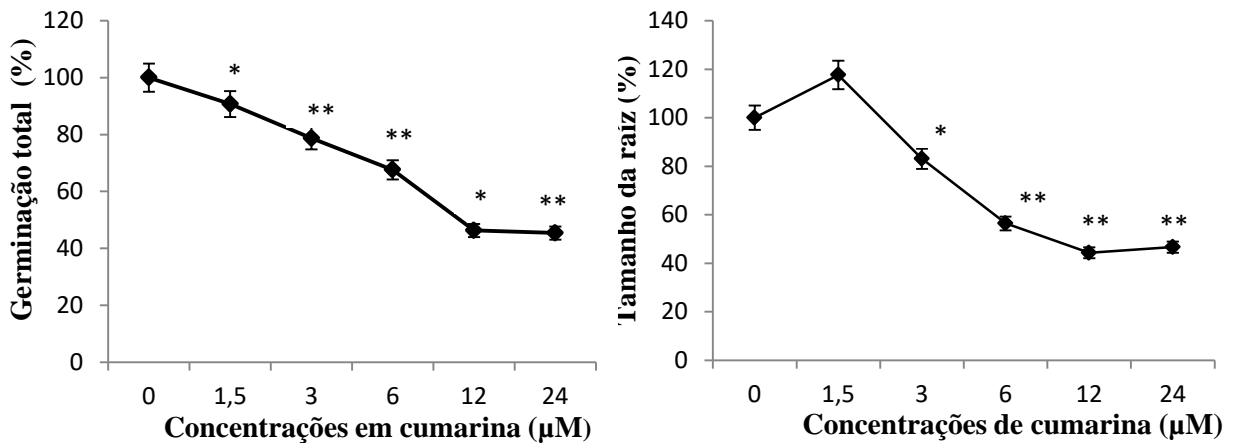
O efeito da cumarina sobre a germinação e o crescimento radicular foi fortemente significativo (FIGURA 1A).

Todos os índices de germinação (TABELA 1) como a velocidade de germinação (S), a germinação acumulada (AS) diminuíram aproximadamente 60% na maior concentração da cumarina (24 μM), quanto ao crescimento da radícula (comprimento total da raiz, CTR) a partir de 6 μM ocorreram reduções de 40% no comprimento, seguida de reduções de 54 e 56% em 12 e 24 μM , respectivamente. A redução do crescimento da raiz foi dependente da dose. O IC_{50} para inibir o crescimento da raiz em 50% foi de 14 μM .

Quanto à morfologia da raiz, as plântulas submetidas às concentrações da curva dose-resposta, o controle da *Arabidopsis thaliana* (FIGURA 2B) ilustra uma estrutura típica e bem organizada, uniforme em espessura e com linhas longitudinais de células simétricas, com o eixo da raiz primária paralelo à direção do crescimento. A partir de 3 μM , observou-se deformações teciduais com crescimento desordenado das células em, indução da proliferação de pêlos em regiões medianas e ápices da raiz. Em 6 e 12 μM , fica evidente o espessamento do ápice radicular. Na maior concentração de cumarina (24 μM) ocorreu a formação de

numerosas raízes laterais. Além disso, ocorreu o aumento da espessura da raiz com o aumento da concentração da cumarina.

Figura 1-Curva dose-reposta da germinação e crescimento inicial da raiz de *A. thaliana* (em relação ao controle) submetidas a concentrações crescentes de cumarina (0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 μM) durante 14 dias.



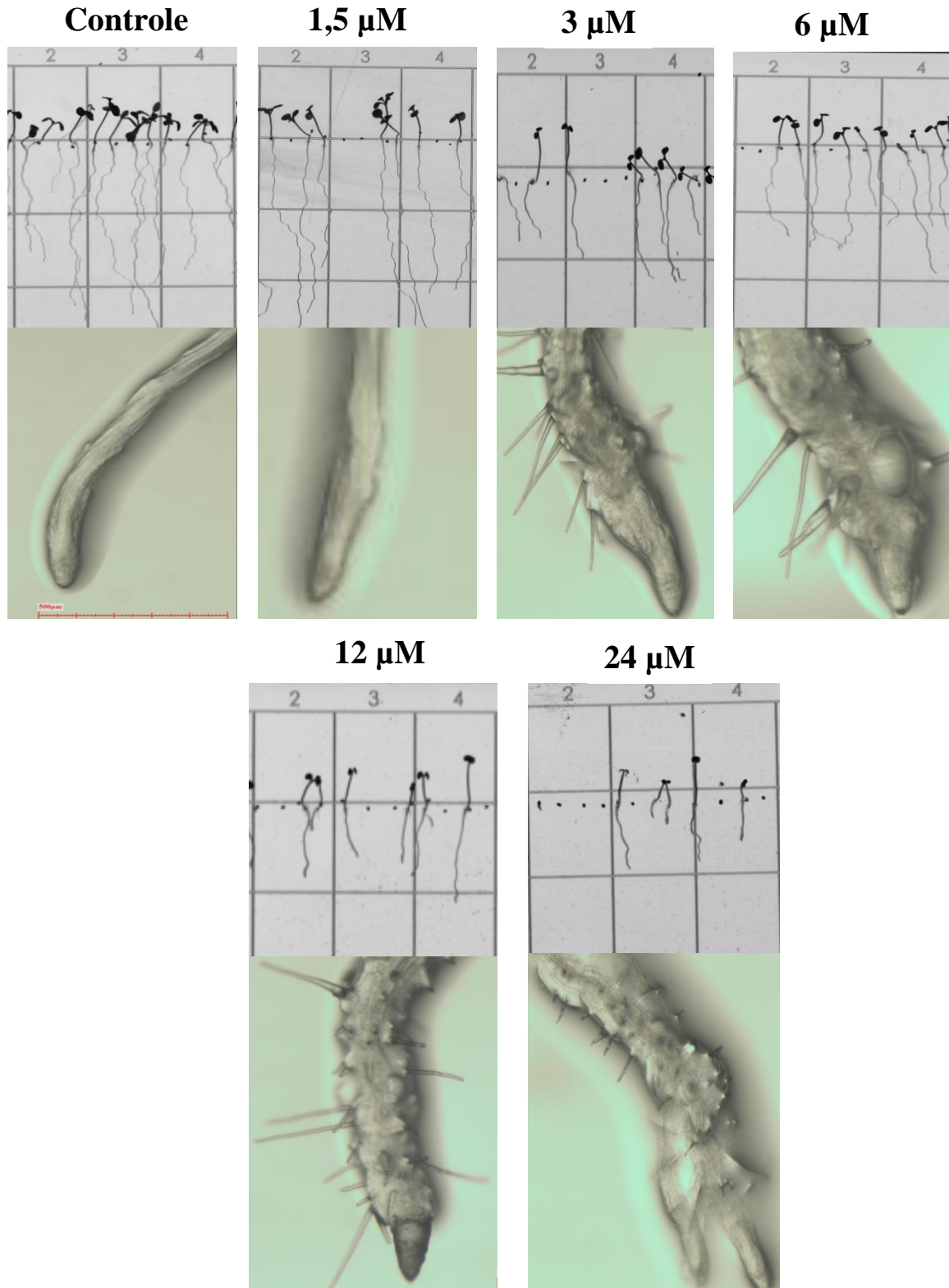
Legenda: *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$.

Tabela 1-Índices da germinação, Germinação total [GT (%)], Velocidade média da germinação (S), Velocidade de germinação acumulada (AS) e Comprimento total da raiz (CTR) da *A. thaliana* submetidas a concentrações de cumarina (0-24 μM).

	G _T (%)	S	AS	CTR
0 μM	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
1,5 μM	81 ^b	92 ^b	94 ^b	117 ^b
3,0 μM	70 ^c	74 ^c	81 ^c	83 ^c
6,0 μM	60 ^c	67 ^d	64 ^d	56 ^d
12 μM	41 ^d	46 ^e	46 ^e	46 ^e
24 μM	40 ^d	37 ^e	37 ^e	44 ^e
C.V.(%)	14	17	20	8

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$ (teste Tukey). $N = 24$.

Figura 2-Imagens das plântulas da *A. thaliana* submetidas às concentrações da curva dose-resposta durante 14 dias, fotoperíodo de 8 h. B) Imagens superiores mostram *Arabidopsis thaliana* crescendo em placas de Petri quadrados e as imagens abaixo foram capturadas em microscópio eletrônico com amplificador. Escala: 500 μm .



Fonte: Do autor (2018).

Figura 3-Imagens das plântulas de *A. thaliana* tratadas com IC₅₀ da cumarina (14 μM). (A) Controle. (B) Plântula de 7 dias de idade tratada com IC₅₀ da cumarina, (C) Plântula de 14 dias tratada com IC₅₀ da cumarina. RE - raiz ectópica. Escala: 500 μm.

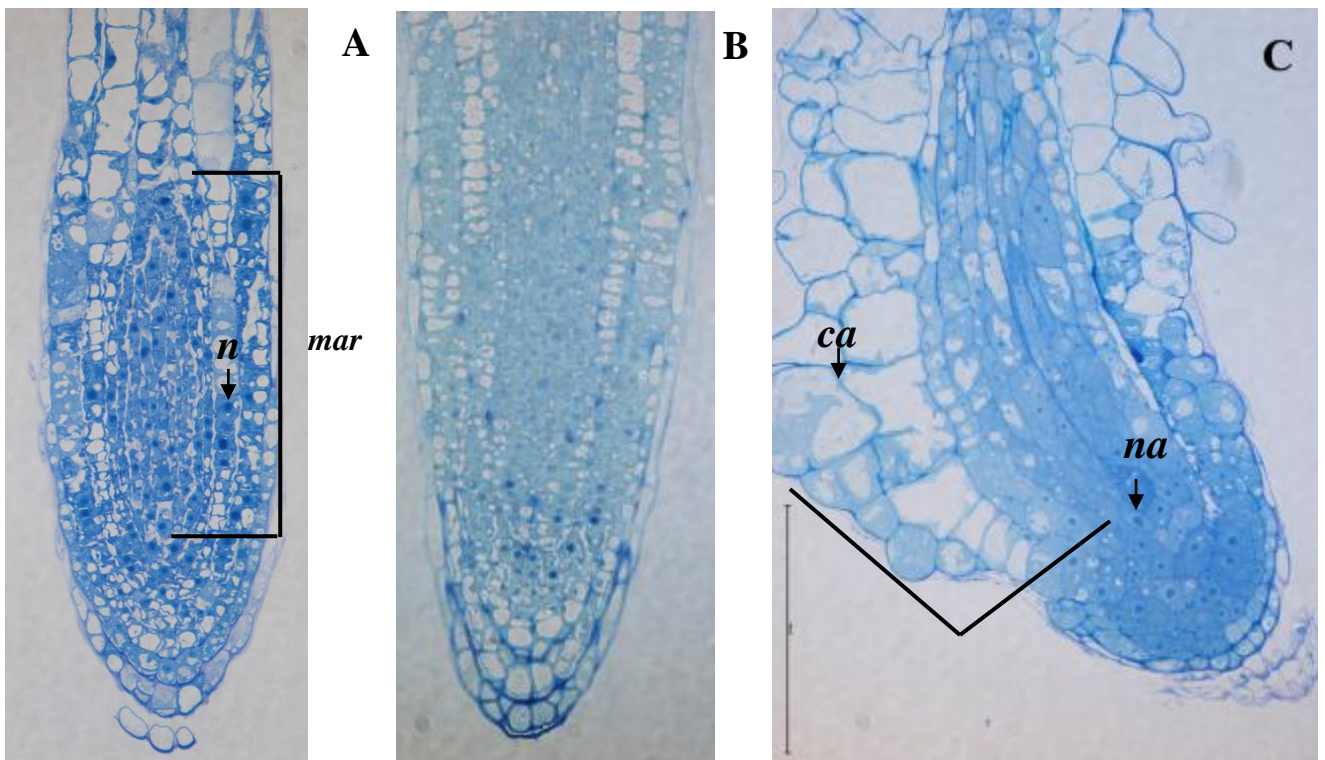


Fonte: Do autor (2018).

As plântulas tratadas com IC₅₀ da cumarina, durante 14 dias (FIGURA 3C) apresentaram pelos radiculares emergindo do ápice da raiz principal, e a presença de raiz ectópica (desenvolvimento de estruturas em lugares não adequados), o que pode ser devido à redução da dominância apical. Enquanto as plântulas do controle e as cultivadas durante 7 dias com a cumarina, apresentaram estrutura típica, com linhas longitudinais de células simétricas e pelos somente na zona pilífera da raiz.

As seções semi-finas (0,7 μm) analisadas por microscopia óptica, demonstraram algumas anormalidades no desenvolvimento da raiz (FIGURA 4), principalmente após 14 dias de cultivo (FIGURA 4C). As células das zonas de crescimento e de diferenciação, apresentaram forte desorganização, com células de diferentes tamanhos e formas, núcleos alongados e amorfos (FIGURA 4C). As raízes das plântulas do controle apresentaram células retangulares, núcleos redondos e isodiamétricos, todos em posição central (FIGURA 4A). Entretanto, as raízes tratadas durante 7 dias (FIGURA 4B) não demonstram alterações morfológicas, quando comparadas ao controle.

Figura 4-Imagens do microscópio de luz (20x) de seções longitudinais semi-finas de ápices de raízes de *Arabidopsis thaliana* coloridas com azul de toluidina. (A) Controle, (B) Plântula de 7 dias de idade tratada com IC_{50} da cumarina 1,2-benzopirona, (C) Plântula de 14 dias tratada com IC_{50} da cumarina. n-núcleo, na-núcleo assimétrico, ca-célula assimétrica, mar- meristema apical da raiz.



Fonte: Do autor (2018).

4 DISCUSSÃO

A cumarina induziu efeitos fitotóxicos na espécie *Arabidopsis thaliana* em concentrações muito baixas de IC₅₀ (14 µM). Esses efeitos incluíram redução da germinação e do crescimento radicular, desorganização tecidual, aumento da presença de pelos radiculares e formação de raízes ectópicas. O IC₅₀ encontrado no presente estudo está muito abaixo do observado por Abenavoli et al., (2008) de 324 µM e por Kupidłowska (2001) 500 µM para inibir 50% do crescimento da raiz de *A. thaliana*, isso pode indicar a maior sensibilidade do ecótipo utilizado no presente estudo.

De acordo com Yuksel e Aksoy (2017), a cumarina atua na redução da porcentagem de germinação das sementes, interferindo nas várias fases da mitose e aumentando o surgimento das aberrações cromossômicas nas células meristemáticas.

A cumarina também impede a divisão celular, mas não a diferenciação, propiciando a vacuolização e conseqüentemente o espessamento radicular, já observado em estudos anteriores (ABENAVOLI et al., 2003; KUPIDŁOWSKA, 2001). A vacuolização ocorre devido à redução da distância entre a zona de formação da raiz lateral e do meristema apical. Além disso, a cumarina muda a direção do crescimento celular, induzindo uma expansão radial nas células do ápice do meristema radicular (BASKIN et al. 1992; 1995).

As alterações morfológicas das raízes, induzidas pela cumarina, podem ser provocadas por um desequilíbrio hormonal, que altera os teores e funções da auxina na planta receptora (LUPINI et al., 2014).

A escopoletina, por exemplo, é capaz de reorientar os microtúbulos ancorados às microfibrilhas de celulose na membrana plasmática, responsáveis pelo plano de expansão celular (BAO et al., 2001; GRAÑA et al., 2017), podendo inibir o crescimento da radícula. Este efeito foi anteriormente relacionado à aplicação de auxina exógena. Blancaflor e Hasenstein (1995) observaram a reorientação de microtúbulos de raízes transversais em longitudinais nas raízes de milho, após o tratamento com AIA (ácido-3-indolacético).

Plantas de *Arabidopsis*, tratadas com inibidores de transporte de auxina, reduziram o alongamento da raiz primária e apresentaram espessamento do ápice (Ruegger et al., 1997). Ambos os efeitos foram sugeridos em função do acúmulo de auxina na raiz (MUDAY; HAWORTH, 1994; MUDAY et al., 1995; RUEGGER et al., 1997). A cumarina atua como um análogo da auxina (AIA), como descrito por Graña et al. (2017) ao utilizar escopoletina em plantas mutantes de *A. thaliana*, para a síntese de auxinas, percebeu-se o espessamento da raiz e o desenvolvimento de raízes laterais.

Os danos fitotóxicos apresentados pelas plântulas de *Arabidopsis*, após o tratamento com a 1,2-benzopirona foram superiores aos observados por Graña et al. (2017) ao utilizar a escopoletina, com maior inibição da germinação, do comprimento da raiz e com indução de alterações morfo-anatômicas (aumento do número de raízes laterais, formação de pelos radiculares e desorganização do tecido).

5 CONCLUSÃO

O IC₅₀ da cumarina foi de 14 µM com fortes danos fitotóxicos aos 14 dias de cultivo, apresentando redução do crescimento radicular, aumento da formação de raízes laterais e do número de pelos radiculares formação de raízes ectópicas; células e núcleos assimétricos em raízes de *A. thaliana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENAVOLI, M.R., CACCO, G., SORGONÀ, A., MARABOTTINI, R., PAOLACCI, A.R., CIAFFI, M., BADIANI, M. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. **J. Chem. Ecol.** v.32, n.25, p.489–506, 2006.
- ABENAVOLI, M.R.; NICOLÒ, A.; LUPINI, A.; OLIVA, S.; SORGONÀ, A. Effects of different allelochemicals on root morphology of *Arabidopsis thaliana*. **Allelopathy Journal.** v.22, n.1, p.245-250, 2008 (Short communication).
- ABENAVOLI, M.R., FUGGI, A. Effect of coumarin on growth of cells cultured in liquid medium from carrot (*Daucus carota* L.). **Giornale Botanico Italiano.** v. 129, 989–990, 1995 .
- BAO, Y., KOST, B., CHUA, N.H. Reduced expression of α -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. **Plant J.** v. 28, n.2, p.145-157, 2001.
- BASKIN, T.J., BETZNER, A.S., HOGGART, R., CORK, A., WILLIAMSON, R.E. Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. **J Plant Physiol**, v.19, p.424-438, 1992.
- BASKIN, T.J., BIVENS, N.J. Stimulation of radial expansion in *Arabidopsis thaliana* of actomyosin and vesicle secretion but not by various inhibitors of metabolism. **Planta**, v.197, p.514-521, 1995.
- BENNETT, R., PHIPPS, R., STRANGE, A., GREY, P. Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide tolerant sugar beet: A life-cycle assessment. **Plant Biotechbol. J.** v.2, p.273–278, 2004.
- BLANCFLORE, E.B., HASENSTEIN, K.H. Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. **Protoplasma.** v.185, p.72–82, 1995.
- CHIAPUSIO G., SANCHEZ A.M., REIGOSA M.J., GONZALEZ L., PELLISSIER F. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? **Journal of Chemical Ecology**, v.23, p.2445– 2453, 1997.
- CHON, S.U., KIM, Y.M. Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. **J. Agric. Crop Sci.** v.190, p.145–150, 2004.
- CZELUSNIAK, K.E., BROCCO, A., PEREIRA, D.F., FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Rev. Bras. Plantas Med.** v.14, n.2, p.400-409, 2012.
- GRAÑA, E., COSTAS-GILA, A., LONGUEIRA, S., CELEIROB, M., TEJEIRAB, M., REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRA, A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. **Journal of Plant Physiology.** v.218, p.45–55, 2017.
- GRESSEL, J. Global advances in weed management. **J. Agric. Sci.** v.149, p.47–53, 2011.

- KRAEHMER, H., LABER, B., ROSINGER, C., SCHULZ, A. Herbicides as weed control agents: State of the art: I. Weed control research and safener technology: The path to modern agriculture. **Plant Physiol.** v.166, p.1119–1131, 2014.
- KUPIDŁOWSKA, E. Changes in cell ultrastructure and morphology of *Arabidopsis thaliana* roots after coumarins treatment. **Acta Societatis Botanicorum.** v. 70, n.3, p.187-198, 2001.
- KUPIDŁOWSKA, E., DOBRZYŃSKA, K., PARYS, E., ZOBEL, A.M. Effect of coumarin and xanthoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake, and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. **Journal of Chemical Ecology.** v.20, p.2471–2480, 1994.
- LUPINI, A., ARANITI, F., SUNSERI, F., ABENAVOLI, M.R. Coumarin interacts with Auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regul.** v.74, n.1, p.23–31, 2014.
- MONACO, T.J., WELLER, S.C., ASHTON, F.M. Weed Science: Principles and Practices, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA. 2002.
- MORELAND, E.D., NOVITZKY, W.P. Effects of acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplast and mitochondria. In: Waller GR, ed. *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. Washington DC, USA: ACS Symposium Series, 247–261. 1987.
- MUDAY, G.K., HAWORTH, P. Tomato root growth, gravitropism and lateral development: correlation with auxin transport. **Plant Physiol. Biochem.** v.32, p.193–203, 1994.
- MUDAY, G.K., LOMAX, T.L., RAYLE, D.L. Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, diageotropica. **Planta.** v.195, p.548–553, 1995.
- NAZEMI, A.H., ASADI, G.A., GHORBANI, R. Herbicidal activity of coumarin when applied as a pre-plant incorporated into soil. **Not. Sci. Biol.**v.7, p.239–243, 2015.
- PERGO, E.M., ABRAHIM, D., DA SILVA, P.C.S., KERN, K.A., DA SILVA, L.J., VOLL, E., ISHII-IWAMOTO, E.L. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **J. Chem. Ecol.** v.34, p.499–507, 2008.
- RUEGGER, M., DEWEY, E., GRAY, W.M., HOBBIE, L., TURNER, J., ESTELLE, M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. **Genes Dev.** v.12, p.198–207, 1997.
- SBAI, H., ZRIBI, I., DELLAGRECA, M., HAOUALA, R. Bioguided fractionation and isolation of phytotoxic compounds from *Apium graveolens* L. aerial parts (Apiaceae) **South African Journal of Botany.** v.108, p.423-430, 2017.
- WU, C., ZHAO, G., LIU, D., LIU, S.J., GUN, X.X., TANG, Q. Discovery and Weed Inhibition Effects of coumarin as the Predominant Allelochemical of Yellow Sweetclover (*Melilotus officinalis*). **International Journal of Agriculture and Biology.** v.18, n.1, p.168-175, 2016.
- YUKSEL, B., AKSOY, O. Cytological effects of coumarin on the mitosis of lens culinaris medik. *Fresenius Environmental Bulletin.* v.26, n. 11, p.6400-6407, 2017.

ANEXO

ARTIGO PUBLICADO: FITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mikania laevigata* SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE DUAS ESPÉCIES INVASORAS

FITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mikania laevigata* SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE DUAS ESPÉCIES INVASORAS

Lívia Maria de Lima Santos^{1*} Carolina Mesquita Germano¹, Adenilson Henrique Gonçalves¹,
Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹

1. Departamento de Agricultura, UFLA, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

*Autor para correspondência livia-linne@hotmail.com

RESUMO

Produtos naturais tem se mostrado eficazes no controle de plantas invasoras em áreas de produção agrícola. Dentre esses, os óleos essenciais destacam-se por serem bons agentes alelopáticos. Objetivou-se avaliar a fitotoxicidade do óleo essencial de *Mikania laevigata* no crescimento inicial das plantas invasivas *Bidens pilosa* e *Digitaria insularis*. O óleo essencial foi extraído pelo método da hidrodestilação e seus componentes foram analisados por CG-EM. A inibição do crescimento inicial das duas espécies invasoras utilizadas neste estudo foi avaliada utilizando duas concentrações de óleo essencial (0,5 e 1%). Os parâmetros analisados foram comprimentos das raízes e das partes aéreas das plântulas. Na ocorrência de efeitos significativos, os dados obtidos foram submetidos à análise de médias, as quais foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Germacreno D (41,6%) foi o principal constituinte químico encontrado no óleo essencial. Para as duas espécies invasoras testadas, a concentração do óleo essencial a 1% foi a que apresentou melhores resultados para os parâmetros analisados.

Palavras chave: guaco, alelopatia, *Bidens pilosa*, *Digitaria insularis*.

PHYTOXICITY OF MIKANIA LAEVIGATA ESSENTIAL OIL ON THE INITIAL DEVELOPMENT OF TWO INVASIVE SPECIES

ABSTRACT

Natural products have been proven effective in controlling invasive plants in agricultural production areas. Among these, the essential oils stand out as being good allelopathic agents. The aim of this study was to evaluate the essential oil phytotoxicity of *M. laevigata* on the initial growth of the invasive plants *Bidens pilosa* and *Digitaria insularis*. The essential oil was extracted by the hydrodistillation method and its components were analyzed by GC-MS. The inhibition of initial growth of the two invasive species used at this study was evaluated using two concentration of the essential oil (0.5 and 1%). The following parameters were analyzed: lengths of the roots and aerial parts of the seedlings. When the effects presents significant, the data were submitted to the analysis of the means, which were compared by the Tukey test, with 5% significance. Germacrene D (41.6%) was the main chemical constituent found in essential oil. For the two invasive species tested, the concentration of essential oil at 1% was the one that presented the best results for the parameters analyzed.

Keywords: guaco, allelopathy, *Bidens pilosa*, *Digitaria insularis*.

1 INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas sintéticos para combater as plantas invasoras de áreas cultivadas chega a 352,3 mil toneladas por safra

no Brasil (CASSAL, 2014). Embora tenham sucesso no controle das plantas invasoras podem causar danos à saúde humana e ao

ambiente. Além de promover o desenvolvimento de plantas resistentes aos herbicidas. Foram identificados em todo o mundo 249 plantas invasoras resistentes aos herbicidas (144 dicotiledóneas e 105 Monocotiledóneas) (HEAP 2014; ISMAIL et al., 2016).

Neste contexto, os produtos naturais estão ganhando atenção devido ao controle eficaz das plantas invasoras e suas propriedades não poluentes, como rápida degradação no ambiente e baixa toxicidade para os animais (DAYAN et al., 2012). Entre os diferentes produtos vegetais naturais, os óleos essenciais se destacam por serem poderosos inibidores da germinação de sementes e promoverem redução do crescimento inicial de plantas invasoras (AYEB-ZAKHAMA et al., 2017; ISMAIL et al., 2016). Podendo causar diversas alterações morfofisiológicas, como a degradação das membranas celulares e a desestruturação dos microtúbulos (CHAIMOVITSH et al., 2017)

Os óleos essenciais, de maneira geral, são compostos por misturas complexas de substâncias voláteis, caracterizados por um forte odor e sintetizados via metabolismo secundário das plantas. Seus principais constituintes são os fenilpropanóides e terpenóides (ANDRADE et al., 2012).

Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker, conhecida como guaco, é nativa da Floresta Atlântica brasileira e suas folhas são amplamente utilizadas em afecções do trato respiratório devido ao elevado teor de cumarina (1,2-benzopirona), incluída na Farmacopeia Brasileira desde 2005 (BRASIL, 2005; BRANDÃO

et al., 2006). O óleo essencial do gênero *Mikania* é rico em sesquiterpenos e diterpenos (SILVA JÚNIOR et al., 1994).

Os sesquiterpenos são descritos como possuidores de variada atividade biológica, como antialérgica (GHELARDINI et al., 2001), anestésica local (COSTA et al., 2000), antifúngica (ZHENG et al., 1992), anticarcinogênica (CHINO et al., 1996) e diminuição do crescimento de plantas invasoras de áreas cultivadas (AYEB-ZAKHAMA et al., 2017; VERDEGUER et al., 2011).

Bidens pilosa L. (Asteraceae), conhecida popularmente como picão, é originária da América tropical, sendo uma das plantas invasoras de maior dispersão e dificuldade de controle em áreas agricultáveis (SANTOS; CURY, 2011). *Digitaria insularis* (L.) Mez. ex Ekman. (Poaceae), conhecida popularmente como capim-amargoso, é considerada invasora em mais de 60 países, ocorrendo em mais de 30 culturas de importância econômica (MONDO et al., 2010). Objetivou-se avaliar a fitotoxicidade do óleo essencial de *M. laevigata* sobre o crescimento inicial de *B. pilosa* e *D. insularis*, com vistas a propor a sua utilização no controle de plantas invasoras em áreas de produção agrícola.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

M. laevigata (guaco) foi cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras. Amostra da espécie fr 103

depositada no Herbário ESAL, sob o registro de numeração 57818.

Folhas frescas, sadias e homogêneas no período da manhã, sem precipitação pluvial, foram coletadas e secas a 40°C em estufa com circulação forçada de ar. Após a secagem foram picadas (121,6 g) e a hidrodestilação, em triplicata, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, por duas horas. Os óleos foram separados por decantação, armazenados em frascos âmbar com capacidade de 2 mL e mantidos sob refrigeração (4°C), até as análises químicas. O teor do óleo essencial foi determinado e expresso em g.100g⁻¹ de matéria seca das folhas.

2.2 Análises químicas do óleo essencial

As análises quantitativas foram feitas por cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC) em um sistema Agilent® 7890A, equipado com coluna capilar DB-WAX (30 m x 250 µm x 0,25 µm), utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C.

O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e injetado automaticamente no cromatógrafo empregando volume de injeção de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. A separação dos constituintes voláteis foi realizada em uma rampa de temperatura de 3 °C/min de 60 °C a 230 °C, seguida de uma rampa de temperatura de 10 °C/min até 240 °C, mantendo uma condição isotérmica por um minuto.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão.

A avaliação qualitativa do óleo essencial foi realizada em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 e V, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação aos espectros de massa do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e da literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados com base na equação de Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção citados em literatura (ADAMS, 2007).

2.3 Ensaio fitotóxico

Uma solução “mãe” do óleo essencial foi preparada, a partir de 0,5 g do óleo, utilizando Tween 80, na proporção 1:1 (v/v) e dissolvida em água destilada (q.s.p. 100 mL de solução). A partir desta preparam-se as soluções testes nas concentrações finais 1 e 0,5%. Como controle foi

utilizado uma solução de Tween 80 a 1,0% v/v e água (SILVA et al., 2005). As soluções testadas foram adicionadas apenas no início dos bioensaios, e posteriormente, quando necessário, apenas água destilada foi acrescentada.

Foram utilizadas 10 plântulas com três dias de idade (72h) em cada caixa acrílica, tipo gerbox (dimensões 11x11x4 cm), tendo como substrato duas folhas de papel mata-borrão esterilizadas a 120 °C por 30 minutos. Quatro caixas por tratamento, totalizando 40 plântulas que foram mantidas em câmara de crescimento (BOD) à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 8/16 horas.

Após 10 dias de crescimento, os comprimentos das raízes e das partes aéreas das plântulas foram realizados, com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram expressos em milímetros. A determinação da biomassa seca total das plântulas foi realizada em estufa a 70 °C, em embalagens de papel Kraft, até obtenção das massas constantes. Depois desse período, efetuou-se a pesagem e determinação das médias por repetição, sendo os resultados expressos em miligramas.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (concentrações do óleo essencial x espécies), com quatro repetições. Na ocorrência de efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor do óleo essencial de *M. laevigata* foi de 0,092%, superior quando comparado aos relatos de Duarte et al (2005), que obtiveram 0,05% de óleo essencial a partir de 40 g de folhas frescas de *M. laevigata*.

O óleo essencial de *M. laevigata* constituiu de 82,75% de sesquiterpenos, representados por cinco constituintes químicos (germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, β -cariofileno e óxido de cariofileno). Cerca de 50% do teor de sesquiterpenos totais foi atribuído ao germacreno D (41,6%).

Rehder et al. (2006) também encontraram que o principal sesquiterpeno presente no óleo essencial extraído das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* foi o germacreno D, com 23,6% e 23,4% respectivamente.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas secas de *Mikania laevigata*.

IR ^a	Constituintes	Área (%)
1484	Germacreno D	41,6
1499	Biciclogermacreno	17,49
1580	Espatulenol	10,89
1421	β -cariofileno	9,02
1586	Óxido de cariofileno	3,75
Total (%)		82,75

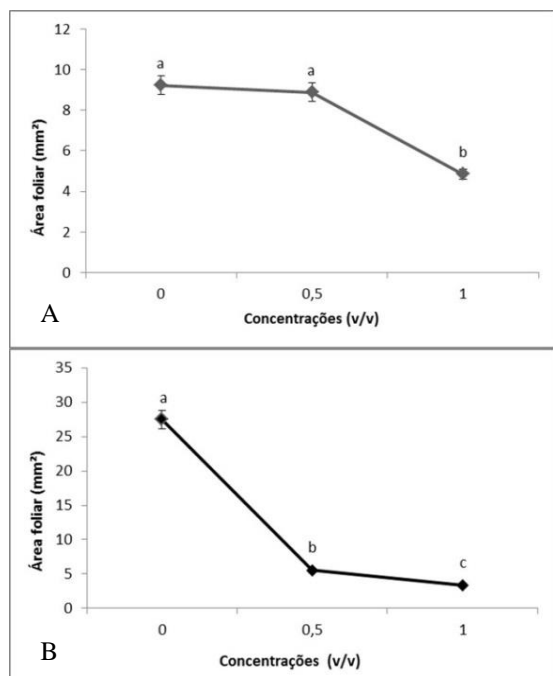
a) Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C8 – C20) em coluna DB-WAX na ordem de eluição.

Na avaliação dos efeitos fitotóxicos, observou-se variação em função da concentração e da planta receptora (*D. insularis* e *B. pilosa*). O óleo essencial de *M. laevigata* na concentração de 1% inibiu o crescimento

radicular (54,77%), do hipocótilo (43,36%), da biomassa seca total (21%) (Tabela 2) e da expansão da área foliar (47,4%) nas plântulas de *D. insularis* em relação à testemunha (Figura 1).

Enquanto a 0,5% do óleo, a radícula de *D. insularis* não foi sensível, mantendo-se com valores similares aos observados no controle, somente o hipocótilo reduziu 24,22% do comprimento. Para *B. pilosa* a concentração do óleo a 0,5% provocou reduções de 23,19% na radícula, 27,86% no hipocótilo (Tabela 2) e 79,87% na área foliar (Figura 1), entretanto a 1% as reduções foram de 58,41 % da radícula, 54,34% do hipocótilo, 18% da massa seca e 87,73% da área foliar, em relação à testemunha.

Figura 1. Área foliar de *Digitaria insularis* (A); e *Bidens pilosa* (B) submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Mikania laevigata*.



*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O parâmetro biométrico mais sensível para detectar a bioatividade do óleo frente às duas espécies invasoras testadas foi à redução

da área foliar. Pode ser observado na Figura 2, nas imagens b e c, que o óleo de *M. laevigata* também provocou em *D. insularis* clorose intensa. Esse fato pode estar relacionado à presença do β -cariofileno (9,02%) no óleo essencial. Segundo Sánchez-Muñoz et al., (2012), o β -cariofileno foi capaz de inibir a fitoeno desaturase em *Physalis ixocarpa*, uma enzima chave na biossíntese dos carotenoides. É sabido que os carotenoides protegem a clorofila da foto-oxidação, e sua carência resultaria em perda da clorofila e clorose evidente, podendo levar a planta a morte. Vários herbicidas que atuam no FSII, como o Paraquat, atua também induzindo a degradação da clorofila, bem como outros mecanismos de ação (SANTOS et al., 1999).

As radículas das plântulas foram mais sensíveis se comparado ao hipocótilo (Figura 2), principalmente na espécie *B. pilosa*, onde foi observado o encurvamento das raízes (1% v/v) e pontos de necrose, ou seja, locais onde ocorreu morte do tecido. Zhu et al., (2016), ao testar o óleo essencial de *Scutellaria strigillosa*, que possui como componente majoritário o germacreno D, também verificaram inibição do crescimento da radícula, no entanto de forma mais expressiva (86%). Segundo Scrivanti (2010), as raízes são mais sensíveis aos metabólitos secundários, pois estão em contato direto com o substrato.

Os resultados do presente estudo indicam que o óleo essencial de *M. laevigata* possui atividade bioherbicida, embora para melhor caracterização da atividade fitotóxica

seja necessário conduzir experimentos adicionais em casa de vegetação e campo. Bem como determinar os principais modos de ação, ou seja, quais são os sítios de ação (alvo molecular) onde o óleo irá atuar na planta receptora.

Tabela 2. Comprimento do hipocótilo (mm); Comprimento da radícula (mm) e Massa seca (mg) das espécies *Digitaria insularis* e *Bidens pilosa*, submetidas ao óleo essencial de *Mikania laevigata* nas concentrações 0, 05 e 1% (v/v).

Concentração do OE (v/v)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Massa seca (mg)
<i>Digitaria insularis</i>			
0	42 ^a	2,56 ^a	0,0055 ^a
0,5 %	39 ^a	1,94 ^b	0,0054 ^a
1%	19 ^b	1,45 ^c	0,0043 ^b
CV %	20	18	14
<i>Bidens pilosa</i>			
0	44 ^a	21,9 ^a	0,0053 ^a
0,5%	33,8 ^b	15,8 ^b	0,0052 ^a
1%	18,3 ^c	10 ^c	0,0043 ^b
C.V.(%)	22	19	7

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 2. Fitotoxicidade de plântulas de duas espécies invasoras de áreas cultivadas submetidas ao óleo de *Mikania laevigata*. *Digitaria insularis*; (A) controle; (B) 0,5% do óleo essencial; (C) 1% do óleo essencial; *Bidens pilosa*; (D) controle; (E) 0,5% do óleo essencial; (F) 1% do óleo ess

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *M. laevigata* na concentração de 1% apresentou potencial herbicida *in vitro*, afetando o crescimento inicial, principalmente radícula e área foliar de *B. pilosa* e *D. insularis*. E clorose, em *D. insularis*.

5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- Andrade, M.A.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R.; Mallet, A.C.T.; Machado, S.M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 43, p. 399-408, 2012.
- AYEB-ZAKHAMA, A.E.; SAKKA-ROUIS, L.; FLAMINI, G.; JANNET, H. B.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Chemical Composition and Allelopathic Potential of Essential Oils from *Citharexylum spinosum* L. Grown in Tunisia. Chemistry and Biodiversity, Tunisia, v. 14, Issue 4, 2017. DOI:0.1002/cbdv.201600225
- BRANDÃO, M.G.L., COSENZA, G.P., MOREIRA, R.A., MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v.16, p. 408-420, 2006. Doi: 10.1590/S0102-695X2006000300020
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il.
- CASSAL, V.B., AZEVEDO, L.F., FERREIRA, R.P., SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. (2014). Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.
- CHAIMOVITSH, D.; SHACHTER, A.; ABU-ABIÉD, M.; RUBIN, B.; SADOT, E.; DUDAI, N. Herbicidal Activity of Monoterpenes Is Associated with Disruption of Microtubule Functionality and Membrane Integrity. Weed Science, Israel v. 65, p-19-30, 2017. DOI: 10.1614/WS-D-16-00044.1.
- CHINO, I.B.; ROUSSIS, V.; PERDETZOGLU, D.; LOUKIS, A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. Planta Medica, Copenhagen, v. 62, p- 377-379, 1996. DOI: 10.1055/s-2006-957914.
- COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. Journal of Ethnopharmacology, Goiânia, v. 72, p.111-117, 2000. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00214-2.
- DAYAN, F.E.; OWENS, D.K.; DUKE. S.O. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. USA, Pest Manag Sci, v 68, p 519–528, 2012. DOI: 10.1002/ps.2332.
- DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Campinas, v. 97, p. 305–311, 2005. DOI: 10.1016/j.jep.2004.11.016.
- GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of betacaryophyllene. *Il Farmaco*, Itália, v. 56, p- 387-389, 2001. DOI: 10.1016/S0014-827X(01)01092-8.
- HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant wheat. *Pest Manag. Sci.* USA, v. 70, p-1306–1315, 2014. DOI: 10.1002/ps.3696.
- ISMAIL, B.S., HALIMSHAH, S., WAN, J.W.A.; YUSOFF, N. Allelopathic Potential of the Leaf and Seed of *Pueraria javanica* Benth. on the Germination and Growth of Three Selected Weed Species Sains Malaysiana, Malasia, v. 4, n. 45, p. 517–521, 2016.
- MONDO, V.H.Z.; CARVALHO, S.J.P. DE; DIAS, A.C.R.; FILHO, J.M. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas

daninhas do gênero *Digitaria*. *Rev. bras. Sementes*, Piracicaba, v. 32, n.1, 2010.

REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M. V. N. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. esp., p.116-118, 2006.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, B.A.; AGUILAR, M.I.; KING-DÍAZ, B.; RIVERO, J.F.; LOTINA-HENNSEN, B. The Sesquiterpenes β -Caryophyllene and Caryophyllene Oxide Isolated from *Senecio salignus* Act as Phyto-growth and Photosynthesis Inhibitors. *Molecules*, México, v. 17, p. 1437-1447, 2012. DOI: 10.3390/molecules17021437.

SANTOS, J.B. & CURY, J.P. Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. *Planta daninha*, Viçosa, v. 29, p. 1159-1171, 2011. DOI: 10.1590/S0100-83582011000500024.

SANTOS, D.M.M.; PITELLI, A.R.; BANZATTO, D.A. Efeitos de herbicidas nos teores de clorofilas de *Spirodela punctata*, Viçosa, *Planta Daninha*, v. 17, n. 2, p. 175-182, 1999. DOI: 10.1590/S0100-83581999000200001.

SCRIVANTI, L.R. Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). *Flora*, Córdoba, v. 205, p. 302-305, 2010. DOI: 10.1016/j.flora.2009.12.005.

SILVA JÚNIOR, A.A; RITTER, M.R.; ZAMBONIM, F.M.; DESCHAMPS, F.C.; TC ACENCO F.A.; BERTOLDI, F.C. Um

novo ecótipo de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) rico em óleo essencial no Sul do Brasil. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, vol. 9, n. 1, p. 1-72, 2015. DOI: 10.5935/2446-4775.20150002.

SILVA, I.D.; TAKATSUKA, F.S.; ROCHA, M.R.; CUNHA, M.G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos, *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Viçosa, 35, p-109-115, 2005.

SOUZA, C.S.M. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. *Revista Verde*, Mossoró, v. 2, n. 2, p. 96-100, 2007.

VERDEGUER, M.; GARCÍA-RELLÁN, D.; BOIRA, H.; PÉREZ, E.; GANDOLFO, S.; BLÁZQUEZ, M.A. Herbicidal activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* essential oils from Chile. *Molecules*, Valência, v. 16, n. 1, p. 403-11, 2011. DOI: 10.3390/molecules16010403.

ZHENG, G.Q.; KENNY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, Minneapolis, v. 55, p. 999-1003, 1992. DOI: 10.1021/np50085a029.

ZHU, X.Z.; HAN, C.X.; GAO, T.; SHAO, H. Chemical Composition, Phytotoxic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Scutellaria strigillosa* Hemsley. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, China, v.19, p. 664-670, 2016. DOI: 10.1080/0972060X.2014.1000389.