

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**PATRÍCIA MOREIRA VALENTE**

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DICLOROMETANÓLICOS DE *Dionaea  
muscipula* ELLIS E DO CONSTITUINTE MAJORITÁRIO, PLUMBAGINA, EM  
BIOENSAIOS VEGETAIS**

**ALEGRE  
2018**

**PATRÍCIA MOREIRA VALENTE**

**PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS  
DICLOROMETANÓLICOS DE *Dionaea muscipula* ELLIS E SEU COMPOSTO  
MAJORITÁRIO, PLUMBAGINA, EM BIOENSAIOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento, na área de concentração de Biologia Evolutiva e Citogenética. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda Praça Fontes

**ALEGRE  
2018**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

M835p Moreira Valente, Patrícia, 1993-  
Prospecção da toxicidade dos extratos diclorometanólicos de *Dionaea muscipula* Ellis e seu composto majoritário, plumbagina, em bioensaios vegetais / Patrícia Moreira Valente. - 2018.

71 f. : il.

Orientadora: Milene Miranda Praça Fontes.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. alelopatia. 2. citotoxicidade. 3. Droseraceae. 4. fitotoxicidade. 5. metabólitos secundários. 6. naftoquinona. I. Miranda Praça Fontes, Milene. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 631.523

---

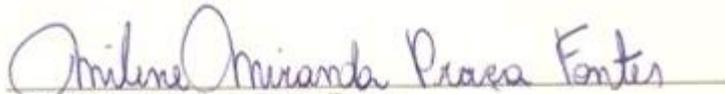
PATRÍCIA MOREIRA VALENTE

**PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS  
DICLOROMETANÓLICOS DE *Dionaea muscipula* ELLIS E SEU COMPOSTO  
MAJORITÁRIO, PLUMBAGINA, EM BIOENSAIOS VEGETAIS**

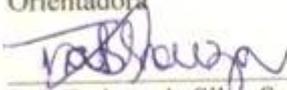
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 10 de Outubro de 2018.

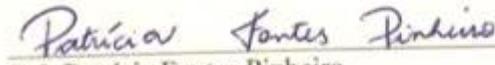
Comissão examinadora



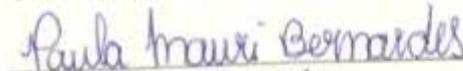
Dr.<sup>a</sup> Milene Miranda Praça Fontes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



Dr.<sup>a</sup> Tatiana da Silva Souza  
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr.<sup>a</sup> Patrícia Fontes Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr.<sup>a</sup> Paula Mauri Bernardes

*A minha parceira, mãe e orientadora.*

Dedico.

”Se a educação sozinha não transforma a sociedade,  
sem ela tampouco a sociedade muda.”

(Paulo Freire)

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Vânia Valente.

Minha orientadora, Milene Praça-Fontes.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo, ao Conselho Nacional de Pesquisa, à Universidade Federal do Espírito Santo.

Aos meus gatinhos: Pretinha, Tukinha, Vitória, Félix, Mila, (*in memorium*), Lili, Mel, Nina, Narizinho, Pão cearense.

Aos meus companheiros de república e perrengues: Drielli, Davi, Matheus, Renan e Maria Joana.

Aos presentes que Alegre me trouxe: Cadu, Quezia, Joab, João Paulo e Lorena.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Lucimara, Ariane, Micheli, Cristiana, Thammyres, Gustavo, Paulo, Tefinha, Natália e Aldinha.

Aos velhos amigos por continuar me suportando: Rick, Nathan, Lara, André, Anderson, Thany e Rafael.

As pessoas diretamente envolvidas no projeto: Maria Carolina e Luciano Bueno.

Sem a contribuição de vocês, nada seria possível. Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

PATRÍCIA MOREIRA VALENTE, filha de Vânia Maria Moreira Valente, nascida na cidade de Viçosa – MG, em 12 de agosto de 1993.

Concluiu o Ensino Médio em 2010, no Colégio Equipe, em Viçosa – MG.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas (bacharel) na Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba em fevereiro de 2011, graduando-se em fevereiro de 2016.

Em outubro de 2016 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, linha de pesquisa Biologia evolutiva e Citogenética, na Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-E-UFES), como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, submetendo-se a defesa para obtenção do título de Mestre.

## RESUMO

Diversos metabólitos secundários são sintetizados pelas plantas com o objetivo de garantir sua sobrevivência no ambiente. Na propagação *in vitro* ambientes tóxicos podem surgir com o acúmulo de substâncias químicas em um sistema fechado de cultivo, como observado para plantas de *Dionaea muscipula*, que apresentaram morte precoce com sintomas de autointoxicação. A partir dessas observações, objetivou-se investigar a fitotoxicidade e citogenotoxicidade de diferentes extratos de *D. muscipula* e seu principal constituinte – plumbagina. A análise CG-EM revelou que os extratos de *D. muscipula* variam suas concentrações de plumbagina, sendo 89,71% no extrato da planta viva (EDV) e 53,13% no extrato da planta morta (EDM). A fitotoxicidade foi avaliada nas plantas modelo *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) em concentrações variando de 100 a 1600 mg/L (PPM) para os extratos e de 12,5 a 1600 mg/L para a plumbagina. O percentual de germinação, o índice de velocidade de germinação e os comprimentos da raiz e do coleótilo foram significativamente reduzidos de forma dose-resposta. Os extratos EDM, EDV e a plumbagina causaram alteração no ciclo celular das células meristemáticas da raiz de *L. sativa* e *A. cepa*, evidenciada pela diminuição do índice mitótico (IM) e aumento das aberrações cromossômicas (AC) e nucleares (AN) em concentrações progressivas (100 a 1600 mg/L) nos extratos e (12,5 a 1600 mg/L) na plumbagina. A avaliação citogenotóxica confirmou o efeito mitodepressivo dos compostos testados, embora a intensidade fosse variável. No geral, a plumbagina foi mais tóxica seguida pelo EDV e EDM. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de serem desenvolvidos produtos ecologicamente corretos e aceitáveis para o manejo de plantas daninhas no sistema agrícola, além de indicar a plumbagina como substância fitotóxica responsável pela morte precoce das plantas de *D. muscipula* durante seu cultivo *in vitro*.

**Palavras-chave:** alelopatia, citotoxicidade, Droseraceae, fitotoxicidade, metabólitos secundários, naftoquinona.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem de *D. muscipula*. Fonte: François Gaascht (2013).....15
- Figura 2 - Fórmula estrutural da plumbagina. Fonte: Sigma aldrich (2018).....16
- Figura 3 - Aumento cronológico de plantas daninhas resistentes no mundo.....22
- Figura 4 - Desenho de uma Armadilha de Vênus por William Curtis (1746-1799).....29
- Figura 5 – Evolução de *D. muscipula* in vitro (a) plântula sadia, (b) plântula morta com acúmulo de substância exsudada, (c) planta morta com acúmulo maior de substância exsudada.....32
- Figura 6 - Extrato obtido a partir de plantas de *D. muscipula* mortas durante seu cultivo in vitro. Fonte: autora (2017).....36
- Figura 7 - Cromatograma da fração obtida do extrato de *D. muscipula* por CG-EM.....38
- Figura 8 - Cromatograma com os teores de plumbagina encontrados nos extratos de *D. muscipula*: (a) meio de cultura da planta morta, (b) meio de cultura da planta viva (c) da planta morta, (d) da planta viva por meio de CG-EM.....39
- Figura 9 - Porcentagem de germinação (a), Índice de velocidade de germinação (b), Crescimento radicular (c) e Crescimento aéreo (d) de sementes de *L. sativa* e *A. cepa* tratadas no método direto com diferentes concentrações dos extratos de *D. muscipula* morta (EDM) e *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), água (ÁGUA), diclorometano (DCM) e glifosato (GLIF). Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com água (H<sub>2</sub>O), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente diclorometano (DCM), e as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle positivo glifosato (GLIF), de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.....41
- Figura 10 - Plântulas de *L. sativa* (1) e *A. cepa* (2) com meristemas apicais escurecidos (setas) no tratamento com a plumbagina no método indireto, acompanhados por plântulas desenvolvidas no controle negativo, água.....43
- Figura 11 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *L. sativa* obtidas pelo método direto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.....44

Figura 12 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *Lactuca sativa* obtidas pelo método indireto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P>0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.....46

Figura 13 - Células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com EDM, EDV e PLUM. (A) Núcleos condensados, (B) Núcleos condensados com micronúcleo, (C) Telófase com ponte e micronúcleo, (D) Cromossomo pegajoso, (E) C-Metáfase, (F) Micronúcleo, (G) C-Metáfase poliploide, (H) Anáfase com ponte dupla, (I) Anáfase com atraso e perda cromossômica. Barra: 10  $\mu$ m..... 47

Figura 14 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *A. cepa* obtidas pelo método direto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P>0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles..... 49

Figura 15 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *A. cepa* obtidas pelo método indireto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P>0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles..... 50

Figura 16 - Células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com EDM, EDV e PLUM. (A) Telófase com perda cromossômica, (B) Núcleo condensado com micronúcleo, (C) Núcleo condensado com broto celular, (D) Telófase com ponte de origem aneugênica, (E) Cromossomo pegajoso, (F) Célula binucleada com núcleo condensado, (G) Anáfase com ponte de origem clastogênica, (H) C-metáfase, (I) Anáfase com formação de brotos, (J) Cromossomo pegajoso com início de apoptose, (K) Apoptose, (L) Apoptose. Barra: 10  $\mu$ m.....51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos químicos identificados em <i>D. muscipula</i> Ellis.....	30
Tabela 2 - Obtenção de extratos de meios de cultura e da planta de <i>D. muscipula</i> morta e viva.....	37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS GERAL .....	18
2.1. Objetivos Específicos .....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Utilização de agrotóxicos no Brasil.....	19
3.2. Mecanismos de ação dos herbicidas e inconveniências relacionadas ao seu uso intensivo .....	21
3.3. Metabólitos secundários como potenciais bioherbicidas.....	23
3.4. <i>Dionaea muscipula</i> Ellis e seu potencial biológico.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Material vegetal .....	31
4.2. Procedimentos Experimentais Gerais.....	31
4.3. Obtenção e fracionamento do extrato.....	32
4.4. Análise da composição química e quantificação do composto majoritário nos extratos .....	33
4.5. Teste de fitotoxicidade.....	33
4.6. Teste de citogenotoxicidade .....	35
4.7. Análises estatísticas .....	36
5. RESULTADOS .....	36
5.1. Obtenção e fracionamento dos extratos diclorometanólicos .....	36
5.2. Análise da composição química e quantificação do composto majoritário nos extratos .....	37
5.4. Citogenotoxicidade em <i>L. sativa</i> .....	42
5.6. Citotoxicidade em <i>A. cepa</i> .....	48
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

Em virtude da crescente demanda por alimentos devido ao crescimento populacional, foi necessária uma modernização na agricultura, com a introdução de técnicas de manejo que aumentassem a produtividade, ou reduzissem as perdas de rendimento. Neste contexto, surgem os herbicidas, cuja finalidade é controlar plantas invasoras, conhecidas como ervas daninhas, que competem com a cultura tanto pela demanda de luz quanto de nutrientes do solo (KHUSH, 2001). Segundo Tanveer et al. (2015), as ervas daninhas são responsáveis pela perda de aproximadamente 34% da produtividade agrícola, tornando necessário seu manejo. Contudo, o uso excessivo, intensivo e incorreto dos herbicidas tem acarretado problemas em vários âmbitos ambientais. Plantas daninhas e organismos patógenos estão adquirindo resistência pela seleção natural (OOSTENDORP et al., 2001). Relações ecológicas e biológicas vêm sofrendo desequilíbrio em função da contaminação dos solos, flora, fauna e águas (superficiais e subterrâneas) (SILVA et al., 2012). Animais e plantas estão sendo eliminados como dano colateral a aplicação dos herbicidas em campo, diminuindo a biodiversidade local (DUKE E DAYAN, 2015; ALVES, 2017). Intoxicações ao homem vêm sendo causadas por meio direto na prática agrícola ou indiretamente com a contaminação dos alimentos, quadro clínico que pode levar ao desenvolvimento de doenças neurológicas, hepáticas, respiratórias, renais, cânceres e outros (LONDRES, 2011; INCA, 2015). Segundo o Heap (2018) as plantas daninhas já desenvolveram resistência a 23 mecanismos de ação, muitas com resistência a mais de um.

Os produtos naturais, ou metabólitos secundários, são produzidos por grupos de plantas com funções específicas nos órgãos e tecidos que os sintetizam. Por exemplo, compostos voláteis com odor floral evoluíram para atrair os insetos polinizadores tendo por objetivo aumentar o sucesso reprodutivo das espécies, assim como a capacidade de sintetizar produtos químicos tóxicos evoluiu para afastar patógenos e herbívoros, ou até suprimir o crescimento de plantas vizinhas competidoras (RICE, 1984; BENNET & WALLSGROVE, 1994; PICHERSKY & GANG, 2000; DUDAREVA & PICHERSKY, 2000; PAIVA et al., 2003, ALVES et al., 2018). Representam uma importante fonte de compostos ativos com potencial utilização na agricultura. Frequentemente possuem composições químicas mais diversas, comparado aos herbicidas sintéticos, consequência das suas formas isoméricas. O que proporciona uma ampla gama de

moléculas atuando no metabolismo vegetal, dificultando assim, a aquisição de resistência por estas espécies. Apresentam capacidade de degradação no ambiente mais acelerada, diminuindo a contaminação ambiental causada, em função de seu maior peso molecular com pouca ou nenhuma presença de átomos pesados ou halogênios, assim como a capacidade das substâncias orgânicas serem degradadas por microrganismos no solo (DAYAN et al., 1999; DUKE et al., 2000a; DUKE et al., 2000b; DUKE et al., 2002; SINGH et al., 2010).

Dentre as fontes naturais de importantes metabólitos secundários encontram-se as plantas carnívoras da família *Droseraceae*, que vêm sendo usadas há séculos na medicina tradicional (JUNIPER, et al. 1989; KROLICKA, et al. 2008). Formada pelos gêneros *Aldrovanda* L., *Dionaea* J. Ellis e *Drosera* L., este último com maior número de espécies (ZENK et al., 1969). Os gêneros *Dionaea* e *Drosera* são produtoras de naftoquinonas, flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos, utilizados como substratos nas indústrias farmacêuticas (KREHER et al., 1990).

*Dionaea muscipula* Ellis (Figura 1) é uma planta carnívora com requisitos ambientais muito específicos, o que restringe sua dispersão natural. Para superar esta dificuldade é comumente utilizada a propagação por culturas in vitro (BARRUETO CID e TEIXEIRA, 2014).



Figura 1 - Imagem de *Dioneae muscipula*. Fonte: GAASCHT et al., 2013.

O sistema de cultura in vitro além de proporcionar uma rápida multiplicação da biomassa vegetal, também cria a possibilidade de aumentar o conteúdo de metabólitos

secundários, como a plumbagina (Figura 2) (FUMAGALI et al., 2008; KROLICKA et al., 2008; BANASIUK et al., 2012).

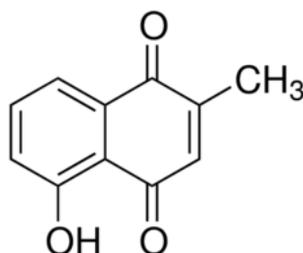


Figura 2 - Fórmula estrutural da plumbagina. Fonte: Sigma aldrich (2018). Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7262?lang=pt&region=BR>>.

A plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) é uma substância natural, de coloração amarela produzida por espécies das famílias Plumbaginaceae, Droseraceae e Ebenaceae que se acumula principalmente em raízes (VAN DER VIJVER, 1972; PADHYE et al., 2012; PANICHAYUPAKARANANT & AHMAD, 2016). Foi descrita como a primeira naftoquinona isolada na espécie *D. muscipula* (THOMSON, 1971) e tem sido relacionada a uma gama de atividades biológicas, como antitumoral (KUO et al., 1997; LIN et al., 2003; KAWIAK et al., 2007; AHMAD et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010; KAWIAK et al., 2012), leishmanicida (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001), antimicrobiana (PAIVA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2009b), bactericida (DURGA et al., 1990), anticarcinogênica (KUO, 2006; MARCHIONATTI et al., 2009), antiinflamatória (REESE et al., 2010), inseticida (KUBO et al., 1980), antioxidante (TILAK et al., 2013), larvicida (GHOSH et al., 2012.), tripanocida (SEPÚLVEDA-BOZZA & CASSELS, 1996), antimalarial (PRADEEPA et al., 2014) e fitotóxica (MEYER et al., 2007), sendo capaz de inibir a germinação de sementes (GONÇALVES et al., 2009a). A plumbagina apresenta caráter fitotóxico, porém são escassas as informações a cerca do seu mecanismo de ação nas células vegetais.

A super acumulação de substâncias tóxicas exsudadas pelas plantas para o meio de cultivo pode ser explorada pela indústria farmacêutica para obtenção de substâncias bioativas de interesse, ou pode comprometer a integridade da planta como observado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Viçosa- Campus Rio

Paranaíba, onde a espécie *D. muscipula* apresentou sintomas de toxicidade acompanhados da morte prematura das plantas (Dados não publicados). Segundo Tokunaga et al. (2004), *D. muscipula* acumula uma grande quantidade de plumbagina como um antialimentar, ou seja, como uma substância defensiva que as impede de serem usadas como alimento por predadores.

A triagem de extratos brutos e compostos purificados com atividade biológica é uma estratégia muito utilizada para a detecção de compostos com potencial uso industrial (VYVYAN, 2002). Uma forma de identificar e realizar a triagem desses compostos é utilizando ensaios biológicos. Os ensaios utilizam espécies vegetais que são organismos modelos, pois, são receptores biológicos diretos no ar, na água e no solo e são de fácil utilização e de baixo custo. Os efeitos provocados pela exposição aos tratamentos são analisados em testes de fitotoxicidade, onde se avaliam desde a germinação ao crescimento radicular e aéreo das sementes cultivadas em diferentes concentrações do extrato ou substância (GRANT et al., 1982, RANK et al., 2002; NOLDIN et al., 2003) A nível microscópico são realizados os testes de genotoxicidade, capazes de avaliar mutações, danos e distorções na estrutura do DNA, e testes citotóxicos, também realizados a fim de identificar o potencial dos agentes em promover alterações significativas nas células dos organismos, ou seja, avaliar se esse dano pode acarretar em um comprometimento de tecidos, órgãos ou do organismo como um todo (FERNANDES, 2005).

A citotoxicidade baseia-se na observação de atraso na proliferação celular, enquanto a genotoxicidade na indução de aberrações cromossômicas (numéricas e estruturais) no ciclo celular em organismos expostos diretamente ou indiretamente a substâncias potencialmente mutagênicas ou carcinogênicas (BENASSI, 2004; TEDESCO & LAUGHINGHOUSE, 2012). Sendo assim, a combinação de análises macroscópicas (germinação e desenvolvimento inicial da planta) e análises microscópicas (índice mitótico e alterações do ciclo celular) é considerada um eficiente método para investigar os efeitos alelopáticos, tóxicos e mutagênicos das substâncias (ANDRADE et al., 2010).

Segundo Dayan et al. (2000) para determinar uma potencial seletividade da substância estudada devem ser utilizadas tanto espécies monocotiledôneas como

eudicotiledôneas como organismos modelos nos bioensaios. A espécie eudicotiledônea *Lactuca sativa* L. (alface) foi utilizada por possuir germinação rápida e padronizada, rápido desenvolvimento das plântulas e elevado índice mitótico (IM) com conjunto cromossômico  $2n=18$ . Enquanto a monocotiledônea *Allium cepa* L. (cebola) foi escolhida uma vez que possui elevado número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; VIDAKOVIC' - CIFREK et al., 2002; MATSUMOTO & MARIN-MORALES, 2004; SILVEIRA et al., 2017).

Buscando avaliar o potencial alelopático de *Dionaea muscipula* cultivada *in vitro*, foram investigadas as composições químicas dos extratos diclorometanólicos obtidos a partir do meio de cultivo, onde as plantas se encontravam vivas (EMDV) e após sua morte (EMDM), e diretamente de plantas coletadas vivas (EDV) e mortas (EDM). Os extratos com rendimento suficiente e o composto majoritário encontrado foram testados frente à germinação, desenvolvimento inicial das plântulas e alterações no ciclo celular de células meristemáticas de raízes de *L. sativa* e *A. cepa*. Os dados obtidos forneceram informações a cerca do mecanismo de ação que ocasionou a autointoxicação das plântulas de *D. muscipula* em seu cultivo *in vitro* e identificou a substância aleloquímica nos extratos com base no seu potencial fitotóxico, citotóxico e genotóxico.

## 2. OBJETIVOS GERAL

Avaliar a composição química dos extratos de *D. muscipula* obtidos a partir de plantas cultivadas *in vitro*, identificar seu constituinte majoritário e determinar o potencial alelopático desses compostos, em diferentes concentrações, através de testes de fitotoxicidade e citogenotoxicidade nas plantas modelo, *L. sativa* e *A. cepa*.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Analisar a composição química dos extratos obtidos da planta viva, morta e dos meios de cultura contaminados por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), para determinar a fonte da substância tóxica;

- Quantificar a presença do constituinte majoritário nos extratos de *D. muscipula* e nos extratos do meio de cultura onde foram observados sintomas de autointoxicação;
- Desvendar as possíveis ações fitotóxica, citotóxica e genotóxica do constituinte majoritário através da análise do ciclo celular de raízes de *L. sativa* e *A. cepa* em diferentes concentrações visando determinar a origem da morte prematura de *D. muscipula in vitro*;
- Realizar o estudo da atividade fitotóxica, citotóxica e genotóxica dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* em *L. sativa* e *A. cepa* visando sua utilização como composto de origem natural para atuar no manejo de plantas daninhas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Utilização de agrotóxicos no Brasil

Desde o início da “revolução verde” na década de 1950, mudanças no processo de produção agrícola e seus impactos sobre o ambiente e na saúde humana têm sido observados. Tecnologias baseadas no uso extensivo de agrotóxicos foram disponibilizadas visando um aumento de produtividade, proteção contra pragas e controle de espécies invasoras que competem com a cultura plantada. O uso intensivo de um grande número de substâncias químicas perigosas expôs as comunidades rurais a um conjunto de riscos desconhecidos devido à ausência de informação e o despreparo dos agricultores na aplicação dos produtos nas plantações (MOREIRA et al., 2002).

Os agrotóxicos no Brasil são regidos pela Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Federal nº 4.074/2002 de 04 de janeiro de 2002. A lei define “agrotóxicos e afins” como: “*Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos ou substâncias e*

*produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.*

O termo “defensivos agrícolas” era utilizado antes da Constituição Federal de 1988, sendo substituído por “agrotóxicos” através da mobilização da sociedade civil, evidenciando a toxicidade desses produtos para o ambiente e os seres vivos (KANASHIRO, 2015; MACHADO, 2016).

Legislações recentemente publicadas e seus projetos de lei correspondentes, que visam tornar cada vez mais flexível a regularização dos agrotóxicos, deixam uma preocupação cada vez maior sobre a quantidade desses compostos consumidos pela população brasileira e suas consequências futuras para a saúde e o ambiente. A exemplo, o Projeto de lei (PL) 3.200/2015 visa alterar a lei 7.802/1989 substituindo a terminologia “agrotóxico” por “produto defensivo fitossanitário”, o que diminui drasticamente a percepção de toxicidade intrínseca que essas substâncias apresentam. Outra alteração é a criação de uma Comissão Técnica Nacional de Fitossanitários (CTNFito), de caráter consultivo e deliberativo, com a finalidade de apresentar pareceres técnicos conclusivos aos pedidos de avaliação de novos “produtos defensivos fitossanitários”. O modelo atual permite um maior controle no registro dos agrotóxicos tendo uma autorização tripartite, e não unilateral. No modelo de autorização tripartite, cabe ao Ministério da Saúde (MS), por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) julgar se todas às exigências dos três Ministérios estão sendo atendidas para o registro comercial ser obtido. O PL propõe uma concentração de poder pelo MAPA, órgão que deveria apenas avaliar o desempenho agrônomo dos agrotóxicos no país, excluindo atribuições específicas do Ministério da Saúde e do Ministério do Meio Ambiente (MMA), responsáveis atuais pelas avaliações toxicológicas e ambientais, respectivamente (ALMEIDA et al., 2017; ALENCAR, 2018).

Existem no Brasil duas bases de dados para notificação de intoxicações por agrotóxicos gerenciados pelo Ministério da Saúde: o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), criado em 1980 e o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). Segundo dados obtidos pelo SINITOX entre 2010 e 2016

foram registrados 40.884 casos de intoxicação por agrotóxicos, incluindo consumo agrícola e doméstico, sendo que destes 841 vieram a óbito. O SINITOX informa aos usuários de seu banco de dados que a diminuição no número de casos de intoxicações e envenenamentos registrados nas estatísticas publicadas ocorreu em virtude da menor participação dos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs) nos levantamentos publicados. Assim, o número de casos não vem decrescendo no país, mas sofrem com defasagem de informações (SINAN, 2018; SINITOX, 2018).

O Brasil é considerado o maior consumidor de agroquímicos no mundo desde 2008 (INCA, 2015). Cerca de 430 ingredientes ativos (IAs), 750 produtos técnicos e 1.400 formulações de agrotóxicos estão autorizados pelo MS e pelo MMA e registrados no MAPA para utilização no país. Dos cinquenta mais utilizados, 22 são proibidos na União Europeia e 14 estão em processo de revisão na Anvisa desde 2008, entre eles o líder de vendas, glifosato (CARNEIRO et al., 2015). Dados sobre intoxicação de alimentos por agrotóxicos no período de 2013 a 2015 foram apresentados por Lemos et al. (2018) onde, do total de amostras monitoradas, 19,7% foram consideradas insatisfatórias, sendo que 3% apresentaram concentrações superiores ao limite máximo de resíduo e 18,3% apresentando resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura. Evidenciando o despreparo dos agricultores no momento da utilização dos agrotóxicos no campo.

### **3.2. Mecanismos de ação dos herbicidas e inconveniências relacionadas ao seu uso intensivo**

As elevadas dosagens de herbicidas empregados, geralmente com o uso contínuo de apenas um tipo de mecanismo de ação, proporcionam um aumento no número de plantas daninhas e patógenos resistentes, devido à seleção natural. O mecanismo de ação está relacionado à inibição de processos bioquímicos e biofísicos, que ocorrem no interior da célula. Normalmente, seguido por esse processo inicial, acontecem diversas outras reações químicas que são necessárias para matar efetivamente a planta, cujo somatório é intitulado modo de ação, ou seja, o efeito final expresso nas plantas após uma série de eventos que matam ou inibem seu desenvolvimento, devido à inibição da atividade de enzimas/proteínas nas células. Assim, os herbicidas que apresentam o

mesmo mecanismo de ação produzirão sintomas de lesão semelhantes nas plantas. (ROSS & CHILDS, 1996; VIDAL, 1997; MARCHI et al., 2008).

Em 2017 já existiam 495 casos de plantas daninhas resistentes a 23 mecanismos de ação conhecidos no mundo (Figura 3), sendo 256 eudicotiledôneas e 239 monocotiledôneas. Algumas espécies apresentam resistência a mais de um sítio de ação, totalizando 255 espécies resistentes a 163 herbicidas diferentes, distribuídas em 70 países (HEAP, 2018).

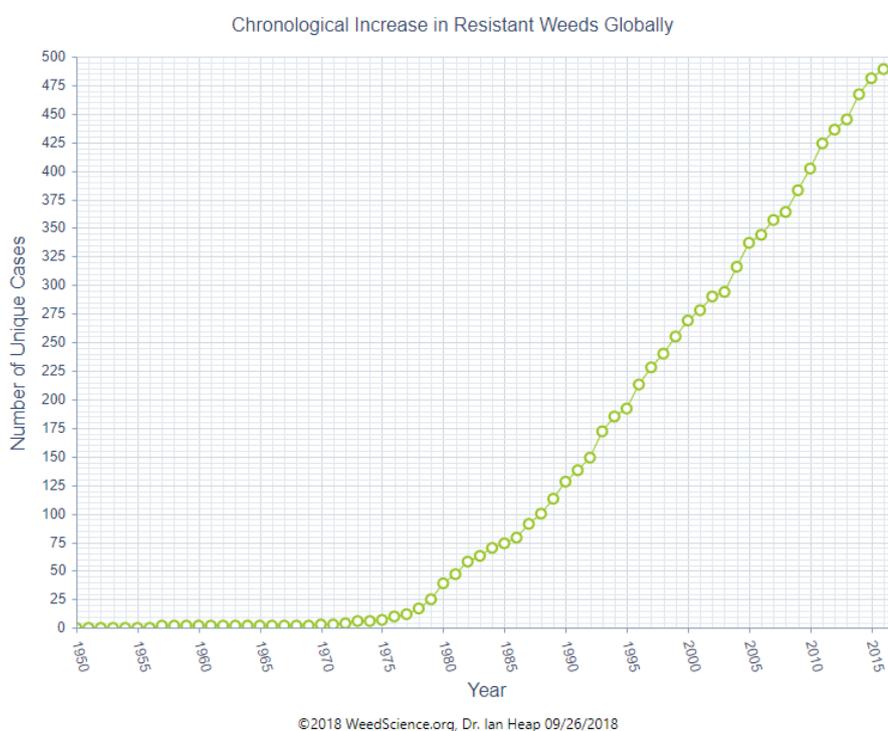


Figura 3 - Aumento cronológico de plantas daninhas resistentes no mundo. Fonte: HEAP, 2018. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Graphs/ChronologicalIncrease.aspx>>. Acessado em: 26/09/2018.

O uso contínuo e indiscriminado de herbicidas também pode levar a desnutrição do solo, aumentando cada vez mais a necessidade da utilização de insumos químicos para a produção agrícola. Além da degradação dos biosistemas naturais, a intoxicação da população e os efeitos crônicos da exposição aos agrotóxicos também são motivos de preocupação. De acordo com o relatório do Conselho de Direitos Humanos sobre o direito à alimentação, publicado pela Organização Mundial das Nações Unidas (ONU)

em 2017, o contato com os pesticidas pode causar câncer, Alzheimer, Parkinson, transtornos hormonais, problemas de desenvolvimento e esterelidade. Podendo também causar danos neurológicos, como perda de memória e redução da capacidade visual ou motora, além de alergias, asma e hipersensibilidade (SILVA et al., 2012; INCA, 2015).

### **3.3. Metabólitos secundários como potenciais bioherbicidas**

Os herbicidas são substâncias químicas responsáveis por suprimir ou dificultar o desenvolvimento de espécies daninhas, plantas que comprometem a produtividade de culturas agrícolas com interesse comercial (ROMAN et al., 2007). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), as vendas de pesticidas totalizaram US\$ 8,9 bilhões em 2017, sendo o segmento de herbicidas responsável pelo maior volume de vendas, com 35% do total. Embora seja um método eficaz no controle de espécies indesejáveis, os impactos ocasionados pelos compostos sintéticos no ambiente podem ser catastróficos. Problemas como o elevado potencial de lixiviação (Capacidade de se deslocar no perfil do solo), alta persistência no solo e baixa solubilidade em água são relatados por Almeida et al. (2006).

A exposição frequente e repetitiva dessas substâncias também impôs uma grande pressão de seleção natural nas plantas, como consequência, foi observada a sobrevivência de plantas daninhas após a aplicação de doses, antes, consideradas letais aquela espécie. Diminuição do rendimento da colheita, produtos sem a qualidade exigida pelo mercado consumidor e inviabilização da utilização de importantes herbicidas, são algumas consequências da resistência adquirida por algumas espécies indesejáveis. A necessidade constante de substituir os herbicidas empregados no cultivo agrícola e o conhecimento popular sobre as atividades medicinais das plantas, explorado pela indústria farmacêutica, estimulou a pesquisa de espécies vegetais sob o ponto de vista fitoquímico (PERES & MALHEIROS, 2001; SILVA et al., 2017).

O Brasil é detentor de seis grandes domínios fitogeográficos: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal, e a exclusiva Caatinga. Isto significa uma variedade de fitofisionomias, habitats, micro-habitats e tipos de vegetação ocupados por uma ampla diversidade de plantas, fungos e animais. Em 2010, através do projeto “Lista do Brasil”, foi montada uma plataforma online para a elaboração de um catálogo de

plantas e fungos no Brasil com o objetivo de atualizar e manter atualizados os dados de diversidade compilados no país. Em 2016 foi apresentada a continuação do projeto intitulado “Projeto Flora do Brasil” com cooperação do Centro Nacional de Conservação da Flora bem como do The New York Botanical Garden. O projeto conta com quase 700 pesquisadores trabalhando em tempo real para a divulgação de novas informações que vão desde nomenclaturas, distribuição geográfica, substrato, tipos de vegetação até imagens de exsicatas depositadas nos herbários virtuais. Neste momento, são reconhecidas 46650 espécies para a flora brasileira, sendo 4754 de Algas, 33221 de Angiospermas, 1567 de Briófitas, 5719 de Fungos, 29 de Gimnospermas e 1360 de Samambaias e Licófitas. Estima-se que de 8,8 a 12,8% das quase 500 mil espécies de plantas que existem no mundo encontram-se no Brasil. Porém apenas cerca de 5% das plantas têm seus fitoquímicos conhecidos e, uma porcentagem ainda menor, suas atividades biológicas documentadas (FORZZA, et al., 2010; FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2018).

As plantas superiores produzem uma diversidade de compostos orgânicos utilizados na execução de funções essenciais e na manutenção da espécie, como fotossíntese, respiração e transporte de nutrientes. A esses compostos (aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila) são atribuídas à nomenclatura, metabólitos primários. Derivados do metabolismo primário estão os metabólitos secundários ou produtos naturais, compostos sem ampla distribuição em todas as plantas, mas que executam funções específicas e restritas a espécie ou a família botânica a qual ela se relaciona. Entre os grupos químicos presentes nas plantas encontram-se terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados que estão envolvidos principalmente com seus mecanismos de defesa (TAIZ E ZEIGER, 2013). As substâncias naturalmente produzidas, fitoquímicos, podem ser responsáveis por interferir positivamente ou negativamente no ciclo de vida de outras plantas e insetos, fenômeno denominado alelopatia (SOUZA et al., 2017).

O potencial terapêutico de plantas medicinais tem sido verificado a partir de extratos e óleos essenciais utilizando bioensaios laboratoriais ou em campo, avaliando o potencial que um composto apresenta em promover ou impedir danos a um organismo. Conduzidos em condições controladas, os efeitos provocados por agentes físicos,

químicos ou biológicos em organismos modelos são observados e quantificados para diferentes tempos de exposição e concentração em testes de toxicidade. Para investigar o potencial alelopático dos compostos naturais, testes de fitotoxicidade e citogenotoxicidade utilizando plantas como organismos modelo são mais utilizados. Os parâmetros avaliados na fitotoxicidade vão desde a germinação ao crescimento radicular e aéreo, uma vez que as raízes sofrem o primeiro contato com as substâncias testes e por consequência são as primeiras a demonstrarem os efeitos causados. Reduções nesse parâmetro podem ser originadas por diferentes mecanismos de ação, como deficiência na absorção de nutrientes, inibição da divisão e alongamento celular e morte celular. Assim, é importante associar o teste de citogenotoxicidade para avaliar anormalidades nas fases de divisão celular, nos cromossomos e no núcleo das células, buscando desvendar o modo de ação da substância (RAO, 1989; GRANT, 1982; GRANT, 1994; KONG & MA, 1999; RANK et al., 2002; NOLDIN et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; KUMAR & DWIVEDI, 2016; ARAGÃO et al., 2017).

Trabalhos evidenciando e identificando os compostos químicos responsáveis pelo potencial alelopático de espécies vegetais são importantes bancos de dados para a produção de herbicidas mais específicos e menos nocivos ao ambiente, comparados aos atualmente utilizados na agricultura. Abaixo estão relacionados alguns exemplos do potencial biológico dos compostos naturais investigados por diferentes pesquisadores.

Os efeitos do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus* Labill foram testados na germinação e crescimento inicial das espécies *L. sativa* e *Agrostis stolonifera* (capim-bravo). Foram observados efeitos inibitórios de pré-emergência em ambas as espécies, sendo os efeitos comparáveis ao herbicida metolaclo. Avaliando plantas adultas de alface, pulverizadas com o extrato, foi observada redução de biomassa aérea e radicular, redução do conteúdo protéico e nas concentrações de clorofila revelando diferentes modos de ação, dependendo do local de entrada da fitotoxina. Foram identificados, através de análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) um total de oito compostos fenólicos (clorogênicos, dois derivados  $\beta$ -cumáricos, elágico, hiperosídeo, rutina, quercitrina e 3-O-glicosídeo kaempferol) e outros 5 ácidos orgânicos de baixo peso (cítrico, málico, shikímico, succínico e ácidos fumárico) no extrato aquoso de *E. globulus*. Apesar de terem sido encontrados efeitos fitotóxicos em plantas adultas de

alface, o uso do extrato aquoso de eucalipto seria descartado em pós-emergência, sendo promissor como bioherbicida de pré-emergência (PUIG et al., 2018).

A composição química e os efeitos alelopáticos de *Hydrocotyle bonariensis* LAM (Araliaceae), também foram investigados por Silva et al. (2009), que encontraram 58,1% de monoterpenos e 19% de sesquiterpenos. Os compostos majoritários foram limoneno (53,6%),  $\gamma$ -muuroleno (10,5%), E-cariofileno (2,7%), sabineno (1,9%),  $\alpha$ -copaeno (1,8%), d-cadineno (1,4%) e g-terpineol (0,9%). O óleo teve seus efeitos testados em sementes de *L. sativa* L. e *A. cepa* L. obtendo reduções nas porcentagens de germinação (54% em *L. sativa* e 34% em *A. cepa*) com inibição significativa no crescimento radicular. No crescimento aéreo de *L. sativa* as menores concentrações (0,12 e 0,25%) estimularam o alongamento do hipocótilo entre 4 e 7%, respectivamente. A maior concentração, de 1,0%, inibiu o crescimento aéreo de *L. sativa* em 20%. Em *A. cepa* foi verificada inibição no crescimento aéreo em todas as concentrações com relação dose-dependência.

Os produtos de extração podem variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo em que se encontra no momento da coleta (MASOTTI et al., 2003; ANGIIONI et al., 2006). Extratos aquosos de folhas de *Senna obtusifolia* causaram inibição na germinação e redução da velocidade com que as sementes de *Lycopersicon esculentum* (tomate) germinaram (SOUZA & VENDRAMIM, 2001). O extrato obtido da raiz de *Cenchrus echinatus* L. apresentou atividade inibitória na espécie *Panicum maximum* L. nas concentrações de 100 e 200mg/L (BESSA et al., 2010). O extrato diclorometanólico das folhas de *Curatella americana* L. (lixadeira) apresentou maior capacidade de inibição do que o extrato de seu caule, quando testado na germinação, crescimento radicular e aéreo de *P. Maximum* (capim maximum), evidenciando a diferença de constituição química dos metabólitos secundários em diferentes órgãos da planta (BARBOSA et al., 2008).

Chapla e Campos (2010) avaliaram o potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* nas concentrações de 20, 10 e 5% em bioensaios com *Lactuca sativa*. A maior concentração aplicada foi responsável por reduzir a germinação e o comprimento médio das raízes. Periotto et al. (2004) compararam o crescimento

radicular e aéreo de *L. sativa* L. tratada com extratos de *Andira humilis* Mart. ex Benth. Segundo o pesquisador, o crescimento radicular em *L. sativa* foi mais afetado do que o crescimento aéreo por causa da absorção, translocação e mecanismo de ação dos compostos potencialmente alelopático em contato físico com a raiz.

Seguindo a tendência de minimizar os impactos dos herbicidas sintéticos na produção agrícola, pesquisadores estão selecionando fungos fitopatogênicos para produção de metabólitos secundários com atividade herbicida. Souza et al. (2017) isolaram 39 fungos de plantas infectadas em culturas de arroz. Vinte e oito fungos apresentaram sintomas fitotóxicos contra a planta *Cucumis sativus* L. (pepino), o fungo VP51, identificado como pertencente ao gênero *Diaporthe*, com o melhor potencial bioherbicida. Também utilizando *Diaporthe* sp. Bastos et al. (2017) produziu um bioherbicida por fermentação em estado sólido (SSF) com potencial uso em pós-emergência. Uma formulação utilizando 5,5% de óleo de palma, 5,5% de adjuvantes e HLB (balanço hidrofílico lipofílico) 15,0 resultou em uma eficiência três vezes maior do que o produto não formulado. Estudos trazendo formulações com o objetivo de potencializar o efeito bioherbicida de produtos naturais estão aumentando. Todero et al., 2018 buscou potencializar o efeito fitotóxico de fungos do gênero *Phoma* sp, utilizando óleo de palma e Tween<sup>®</sup>80 obtendo uma formulação de grande potencial para pré-emergência e pós-emergência das plantas daninhas *Bidens pilosa*, *Conyza canadensis* e, principalmente, *Amaranthus retroflexus*.

A atividade alelopática raramente é resultado de uma única substância, devido à complexidade do número de componentes encontrados nos óleos essenciais, pode não ser determinado com precisão qual (is) componente (s) é responsável pela atividade biológica evidenciada na literatura. Entretanto, estudos com alguns componentes isolados podem ser desenvolvidos para verificar a eficácia da atividade, ou ainda, pode ser sugerido que determinados componentes apresentem efeito biológico sinérgico (PERES & MALHEIROS, 2001; BERNARDES et al., 2017).

Fagodia et al. (2017) avaliaram a fitotoxicidade e a citotoxicidade do óleo essencial de *Citrus aurantiifolia* e seus constituintes majoritários, limoneno (40,92%) e citral (27,46%). Os índices de germinação, crescimento radicular e aéreo foram testados nas concentrações de 0,10 a 1,50 mg/mL nas espécies *Avena fatua*, *Echinochloa crus-*

*galli* e *Phalaris minor*. Evidenciando um efeito dose-resposta, os índices apresentaram resultados significativamente reduzidos. A diminuição do índice mitótico e o aumento das aberrações cromossômicas nas concentrações de 0,01-0,10 mg/mL, indicam alterações no ciclo celular das células meristemáticas de *A. cepa* quando tratadas com o óleo de *C. aurantiifolia*, citral e limoneno. Sendo o citral o composto de maior toxicidade, seguido pelo óleo de *C. aurantiifolia* e limoneno.

Conforme exposto acima em estudos de diversos pesquisadores, as plantas são excelentes organismos modelo na investigação de toxicidade ambiental, bem como na prospecção de substâncias naturais com potencial alelopático. São atribuídos o potencial alelopático a espécies que possuem componentes químicos comprovadamente fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e /ou mutagênicos, impedindo a germinação ou comprometendo a capacidade de plantas modelos e daninhas de se desenvolverem. As pesquisas relacionadas foram desenvolvidas em condições controladas de laboratório, assim, para confirmar os efeitos observados in vitro devem-se extravasar os experimentos para campo ou casas de vegetações que simulem o ambiente e as interações naturais que nele existem. A investigação da toxicidade dos produtos e extratos naturais é um importante passo no conhecimento das atividades biológicas atribuídas aos mesmos (FATIMA & AHMAD, 2006).

### **3.4. *Dionaea muscipula* Ellis e seu potencial biológico**

Popularmente conhecida como Vênus papa-moscas, Trapézio de Vênus ou Armadilha de Vênus, *Dionaea muscipula* Ellis (Figura 1 e 4) foi descrita em 1770 pelo britânico John Ellis. Seu nome científico é composto das seguintes partes: *Dionaea*: vem do latim "Diana", que é a deusa grega da caça; *muscipula*: vem do latim "musci", que significa "voar", enquanto "pula" significa "armadilhas", então *muscipula* não é mais do que "caçadora com armadilha" escrito em latim. Pertencente à família de hábito carnívoro Droseraceae, assim como *Aldrovanda* e *Drosera*, cada folha de *D. muscipula* consiste de um par de lóbulos articulados que rapidamente se fecham quando estimulados por um inseto visitante. A armadilha criada por suas folhas modificadas permanece fechada até que a vítima esteja morta e digerida, representando assim, a única espécie do gênero *Dionaea*. É nativa de zonas úmidas subtropicais da Carolina do Norte e do Sul nos Estados Unidos e é encontrada em solos com baixas concentrações

de nitrogênio e fósforo. Possui um crescimento lento e resistência ao fogo e a baixas temperaturas, o que contribui para o sucesso de seu cultivo ao redor do mundo (WIDHALM & RHODES, 2016; PAVLOVIC et al., 2017; PÉREZ et al., 2017).



Figura 4 - Desenho de uma Armadilha de Vênus por William Curtis (1746-1799). Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/curtis/images/785.jpg>> Acessado em: 20 jun.18

Tradicionalmente, sua propagação é realizada com sementes, estacas de folhas ou partes basais da planta. Porém, a técnica de multiplicação atual mais utilizada pelos produtores ornamentais é a cultura de tecidos de *D. muscipula* (PÉREZ et al., 2017). A utilização do cultivo *in vitro* traz variadas possibilidades quando se leva em consideração a possibilidade de se controlar totalmente o ambiente em que as plantas irão se desenvolver. Sendo assim, a cultura de tecidos se torna uma ferramenta indispensável para que possamos multiplicar *Dionaea*, entre outras plantas carnívoras, com alta qualidade fitossanitária (BARRUETO CID E TEIXEIRA, 2014), utilizando-se da propagação vegetativa deste material.

Além disso, o uso de elicitores bióticos e abióticos pode elevar a síntese de compostos farmacologicamente ativos, como naftoquinonas, flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes como metabólitos secundários importantes nos gêneros *Dionaea* e *Drosera* (ZENK et al., 1969; KREHER et al., 1990; WANG & ZONG, 2002). A super acumulação dessas substâncias exsudadas pelas plantas para o meio de cultivo também pode comprometer a integridade da planta como observado no laboratório de cultura de tecidos da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, onde a espécie apresentou sintomas de toxicidade seguido da morte das plantas.

A análise dos metabólitos secundários isolados e identificados para a *D. muscipula* (Tabela 1) revela uma diversidade de naftoquinonas, flavonoides e ácidos fenólicos com especial atenção à plumbagina.

Tabela 1 - Compostos químicos identificados em *D. muscipula* Ellis.

Compostos identificados	Referências
Plumbagina, diomuscina e diomuscipulona	MIYOSHI et al., 1984
Plumbagina, hidroxitumbagina 4-O-p-glucopiranosídeo, droserona e 3-cloroplumbagina	KREHER et al., 1990.
Plumbagina, 3-cloroplumbagina, 8,8'-biplumbagina (maritina), 1-O- $\beta$ -glicoilglucose, ácido elágico, ácido 3-O-metilgláico, 3,3-di-O ácido O-metileláico, glucosídeo e 4,4'-di-glucosídeo do ácido 3,3'-di- metileláico	PAKULSKI & BUDZIANOWSK, 1996.
Plumbagina	HOOK, 2001.
Plumbagina, ramentaceona, quercetina e miricetina	KROLICKA et al., 2008.
Plumbagina	BANASIUK et al., 2012

A plumbagina é produzida por espécies das famílias Plumbaginaceae, Droseraceae e Ebenaceae em suas folhas, cascas e com maior acumulação em raízes. Em plantas carnívoras, a plumbagina é produzida pela via acetato-malato, onde os precursores são acetil-CoA e malonil-CoA (VAN DER VIJVER, 1972; CROUCH et al., 1990; PANICHAYUPAKARANANT e AHMAD , 2016; TOKARZ et al., 2018).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material vegetal**

Para os testes biológicos foram utilizadas sementes comerciais de *Lactuca sativa* L. variedade “babá de verão manteiga” da marca Feltrin Sementes® e sementes de *Allium cepa* L. variedade “baia periforme” da Top seed®, adquiridas em lojas agrícolas. As sementes foram submetidas a um ensaio preliminar com água para verificar sua capacidade de germinação.

### **4.2. Procedimentos Experimentais Gerais**

As plantas de *D. muscipula* (Figura 5) foram manipuladas durante um ano no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba (UFV-CRP). Obtidas de sementes compradas em loja especializada em plantas carnívoras e germinadas in vitro, foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 15 horas à temperatura de  $26 \pm 2$  °C, sob irradiância de cerca de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). O meio de cultura utilizado para manutenção e multiplicação foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com sais na metade da força total,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel e pH de 5,8.

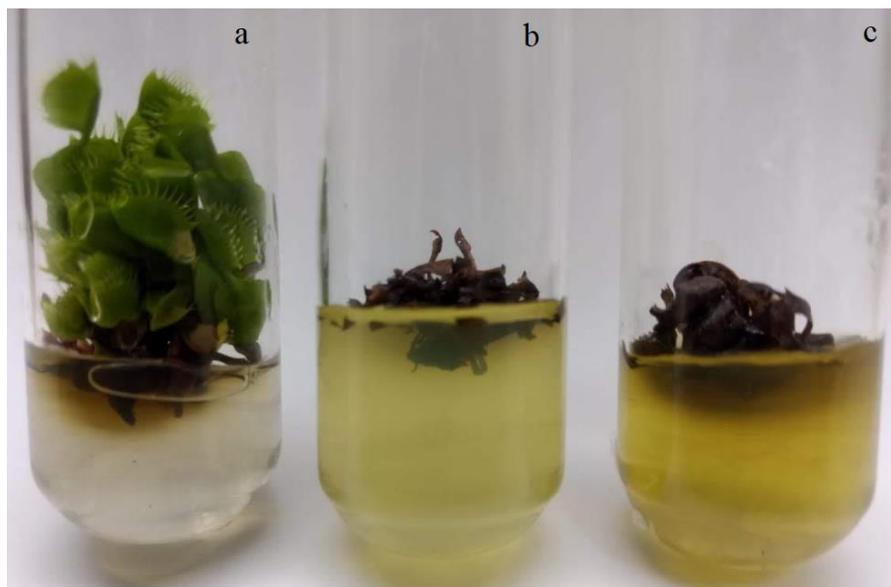


Figura 5 – Evolução de *Dionaea muscipula* *in vitro* durante 3 meses (a) plântula sadia, (b) plântula morta com acúmulo de substância exsudada, (c) planta morta com acúmulo maior de substância exsudada.

Os extratos foram obtidos no Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais da UFV-CRP. A análise química foi realizada no Laboratório de Cromatografia da UFV-CRP. Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

#### 4.3. Obtenção e fracionamento do extrato

Os extratos foram obtidos de plantas vivas (EDV) e mortas (EDM) secas em estufa de ventilação forçada a 36°C e também dos respectivos meios de cultura em que se encontravam *in vitro*, vivas (EMDV) e mortas (EMDM). As amostras foram maceradas e transferidas para Erlemmeyer, onde foi adicionado diclorometano (DCM) como solvente extrator. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 2h. Foram realizadas extrações múltiplas sequenciais, três vezes, para obtenção do máximo de extrato, que foi concentrado a partir da evaporação rotativa em baixa pressão até a completa eliminação do solvente extrator.

#### **4.4. Análise da composição química e quantificação do composto majoritário nos extratos**

Para investigar a presença do composto majoritário na planta e no meio de cultura, os extratos brutos foram dissolvidos em diclorometano até uma concentração de 10 mg/mL e pequenas frações das soluções foram aplicados em placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCD) que foram desenvolvidas com fase móvel de hexano: diclorometano (1: 1 V/V). Em seguida as placas foram observadas sob luz UV a 254 nm, e o constituinte principal relevado foi marcado, raspado e recuperado por extração com o solvente diclorometano (MEYER et al., 2007).

A determinação da composição química das amostras foi realizada pelo preparo de solução 1% de extrato e das frações recolhidas da CCD em diclorometano (10mg do extrato bruto em 1mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), que foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu QP2010 Plus. As condições cromatográficas das análises foram: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária RTX5 (0,25 µm de espessura do filme); empregando Hélio (He) como gás de arraste a uma vazão de 1,0 mL/min, a temperatura do forno foi inicialmente programada a 120°C e seguido de aumento de 5°C/min até atingir 290°C, permanecendo por 20 minutos. Foi injetado 1,0 µL de solução através do auto injetor modelo AOC-20i da marca Shimadzu a uma temperatura de 270°C; a temperatura do detector (ou interface) foi de 280°C; foi utilizada razão de split de 1:20. A quantidade do composto majoritário foi determinada pelo percentual relativo das áreas dos cromatogramas (PAIVA et al., 2004).

#### **4.5. Teste de fitotoxicidade**

Os extratos EDM e EDV foram diluídos utilizando o solvente diclorometano nas concentrações de 1600, 800, 400, 200 e 100 mg/L (ppm), baseadas na quantidade de material disponível. O composto majoritário, identificado nos extratos, também foi diluído em diclorometano nas mesmas concentrações, porém concentrações consecutivas adicionais foram investigadas objetivando encontrar uma menor dosagem com efeitos tóxicos. Sendo assim, o tratamento com o constituinte majoritário (CM) contou com as concentrações de 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg/L.

- Método direto:

O ensaio foi realizado com placas de Petri de vidro contendo 9 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Estes foram embebidos com alíquotas de 2,5 mL das diferentes concentrações dos tratamentos diluídos em DCM. Após a completa evaporação do diclorometano, 25 sementes de *L. sativa* e de *A. cepa* foram adicionadas para germinar em conjunto com 2,5 ml de água ionizada. As placas, então, foram vedadas com plástico filme e acondicionadas em BOD à 25°C ± 2°C durante o período de avaliação. O Delineamento foi Inteiramente Casualizado (DIC) e como controles negativos foram utilizados água ionizada de osmose reversa e o solvente diclorometano, utilizado na diluição dos extratos. O herbicida comercial mais utilizado no Brasil, o glifosato, foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,05%.

- Método indireto:

Sementes de *L. sativa* e *A. cepa* foram germinadas em água até a obtenção de aproximadamente 2 mm de raízes. As plântulas, já formadas, foram transferidas para as placas de Petri seguindo os mesmos parâmetros descritos acima para o método direto utilizando sementes.

O número de sementes germinadas no método direto foi contado após 8, 16, 24, 32 e 48 horas de tratamento com a alface para determinação do índice de velocidade de germinação (IVG). A cebola teve sua avaliação em 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas segundo Bernardes et al. (2015). O IVG foi obtido de acordo com a fórmula:

$$IVG = (N8h \times 1) + (N16h - N8h) \times 1/2 + (N24h - N16h) \times 1/4 + (N32h - N24h) \times 1/8 + (N40h - N32h) \times 1/16 + (N48h - N40h) \times 1/32$$

Onde Nxh representa o número de sementes germinadas em um determinado período de horas. A porcentagem de sementes de *L. sativa* germinadas no método direto (GR) e o comprimento de raiz (CR) foram avaliados após 48 horas com o auxílio de um paquímetro digital. Os mesmos parâmetros foram avaliados para as sementes de *A. cepa*, porém após 96 horas de tratamento.

A parte aérea das plântulas de *L. sativa* foram medidas após 120h para determinar o crescimento aéreo (CA) no método direto (ALVES et al., 2018). As plântulas de *A. cepa* não tiveram seu crescimento aéreo aferido de acordo com Bernardes et al. (2015).

#### **4.6. Teste de citogenotoxicidade**

Após 48 horas de exposição aos tratamentos nos dois métodos de germinação, foram analisadas 10 raízes de *L. sativa* e de cada placa de Petri. Estas foram fixadas em metanol e ácido acético (3:1) e armazenadas em geladeira, conforme descrito pelo protocolo de Aragão et al. (2015). Para as raízes de *A. cepa* empregou-se o mesmo protocolo após 96 horas de tratamento.

As radículas fixadas foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 5N a temperatura ambiente por 18 minutos para a confecção das lâminas. As pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para extração das suas regiões meristemáticas e coradas comorceína acética a 2%. O material foi recoberto por lamínulas e o meristema foi macerado suavemente com o auxílio de uma caneta de ponta redonda. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz da marca NIKON modelo eclipse Ci-S com aumento de 400x e 1000x.

Cinco lâminas de cada tratamento foram preparadas para as análises citológicas, sendo analisadas 1000 células/lâmina totalizando 5000 células, para cada concentração investigada. O mesmo número foi observado para os tratamentos controles.

O índice mitótico (IM) foi avaliado dividindo o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas em cada tratamento. As frequências de alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) foram calculadas dividindo o número de alterações pelo número total de células analisadas. Foram contabilizadas as alterações cromossômicas dos tipos: cromossomo perdido, cromossomo aderente, poliploidia, C-metáfase, ponte cromossômica e atraso. As frequências de micronúcleos (MNC), brotos celulares e núcleos condensados observados foram categorizadas como as alterações nucleares (ARAGÃO et al., 2015; ALVES et al., 2018). A genotoxicidade dos compostos foi avaliada a partir da contagem

de AC e AN, enquanto o IM foi utilizado para a avaliação do potencial citotóxico (LEME E MARIN-MORALES, 2009; MARTINS et al., 2016).

Os efeitos aneugênicos foram analisados mediante identificação de células em divisão com metáfase irregular (C-metáfase), alterações na anáfase (multipolar, com atraso, etc.), mudanças na telófase (atrasos) e/ou células binucleadas, multinucleadas, perdas cromossômicas e modificações nas proteínas expressas, gerando cromossomos pegajosos ou aderência cromossômica. Os efeitos clastogênicos foram identificados baseando-se na frequência de células com pontes e quebras cromossômicas (COSTALONGA & BATITUCCI, 2014).

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias ao teste de Dunnett à 5% de significância para comparar os tratamentos com os controles (BERNARDES et al., 2015). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo computacional em estatística aplicada à genética "Genes" (CRUZ, 1998).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Obtenção e fracionamento dos extratos diclorometanólicos**

Os extratos obtidos apresentaram característica de um semi-sólido e coloração castanho escuro como observado na figura 6.



Figura 6 - Extrato obtido a partir de plantas de *D. muscipula* mortas durante seu cultivo *in vitro*. Fonte: autora (2017).

Com base nos dados dos extratos (Tabela 2), o rendimento da extração foi maior utilizando a planta *D. muscipula* após a sua morte, uma vez que foi observado um rendimento de 2,23%, valor 16% maior do que o obtido na extração quando a planta ainda se encontrava viva (1,92%).

Tabela 2 - Obtenção de extratos de meios de cultura e da planta de *D. muscipula* morta e viva

Extratos	Identificação	Rendimento (%)
Meio de cultura <i>D. muscipula</i> morta	EMDM	$8,15 \times 10^{-3}$
Meio de cultura <i>D. muscipula</i> viva	EMDV	$8,41 \times 10^{-4}$
Planta <i>D. muscipula</i> morta	EDM	2,23
Planta <i>D. muscipula</i> viva	EDV	1,92

## 5.2. Análise da composição química e quantificação do composto majoritário nos extratos

A plumbagina foi identificada como o composto majoritário presente nos quatro extratos de *D. muscipula* através da cromatografia em camada delgada (CCD), seguido da identificação por CG-EM da maior fração recolhida nas cromatoplacas.

Extratos da planta juntamente com a plumbagina padrão comercial foram submetidos à CCD para confirmar sua presença. Outras frações de compostos em menores concentrações no extrato foram reveladas com a exposição da cromatoplaca de sílica à luz ultravioleta.

As frações dos extratos de *D. muscipula* recolhidas após sua submissão à CCD e identificadas através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) confirmam a capacidade de se isolar a plumbagina pura como o composto majoritário presente nos extratos, conforme mostra a figura 7.

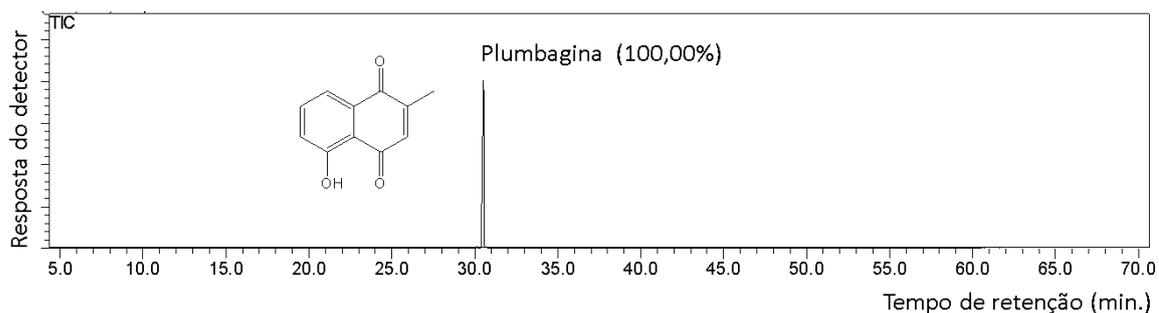


Figura 7 - Cromatograma da fração obtida do extrato de *D. muscipula* por CG-EM.

As porcentagens de plumbagina encontradas nos extratos foram de 36,86% no extrato do meio de cultura da planta morta (EMDM), 54,12% no extrato do meio de cultura da planta viva (EMDV), 53,13% no extrato da planta morta (EDM) e 89,71% no extrato da planta viva (EDV) (Figura 8).

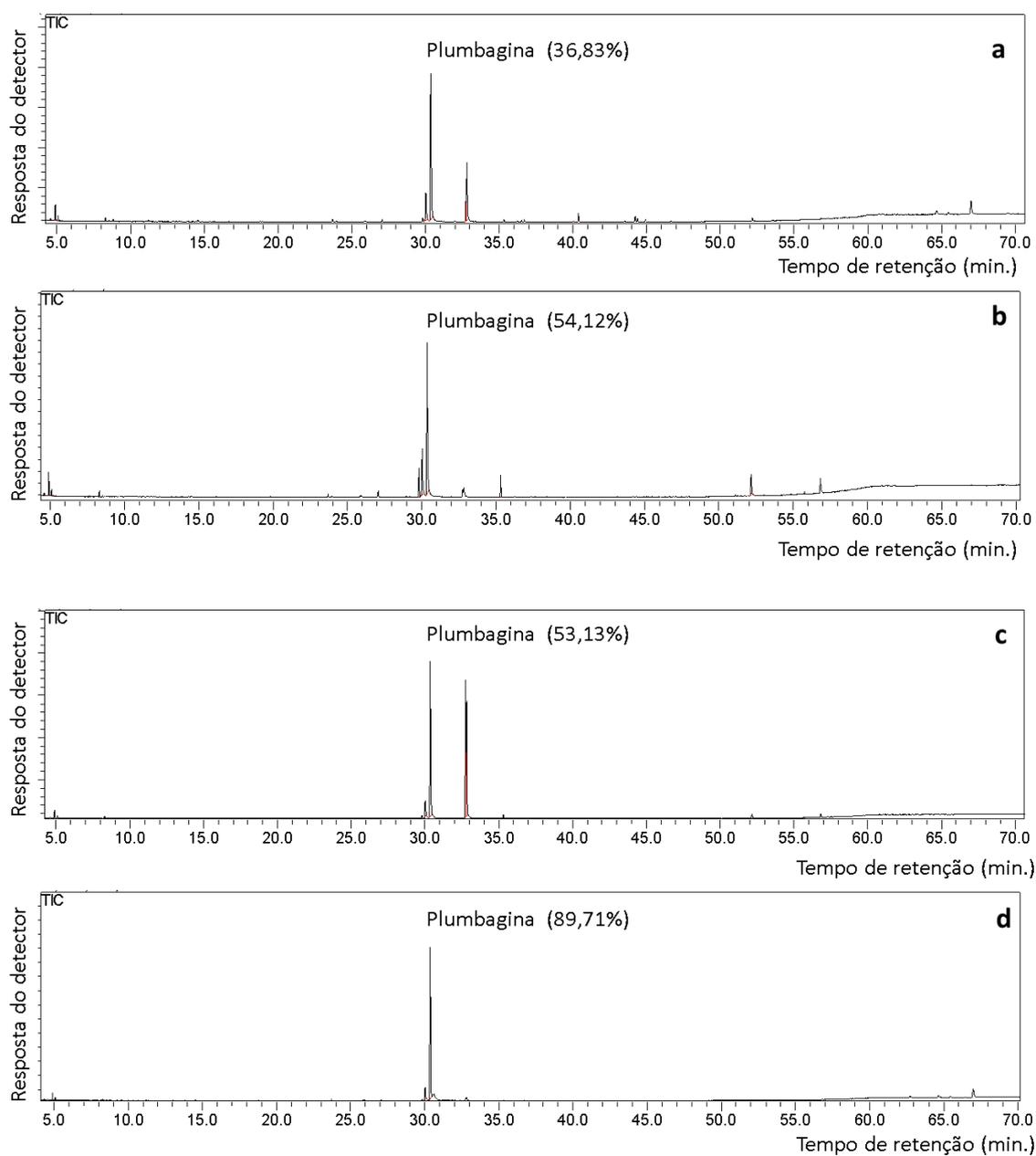


Figura 8 - Cromatograma com os teores de plumbagina encontrados nos extratos de *D. muscipula*: (a) meio de cultura da planta morta, (b) meio de cultura da planta viva (c) da planta morta, (d) da planta viva por meio de CG-EM.

### 5.3. Fitotoxicidade em bioensaios vegetais

Nos ensaios macroscópicos foram avaliados a porcentagem de germinação (% germinação), o índice de velocidade de germinação (IVG), o crescimento radicular (CR) e o crescimento aéreo (CA), sendo este último apenas para *L. sativa*. As sementes, das duas plantas modelo, tratadas com os extratos de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV) e plumbagina (PLUM) apresentaram inibição gradual de todos os parâmetros observados, de acordo com o aumento das concentrações aplicadas (Figura 9).

Os tratamentos com EDM e EDV foram responsáveis por reduzir a % germinação, o IVG, o CR e o CA nas concentrações de 1600, 800 e 400mg/L em *L. sativa*, espécie em que também se observou a redução do IVG e do CR na concentração de 200mg/L e diminuição do CR em 100mg/L em ambos os tratamentos. O tratamento com plumbagina reduziu todos os parâmetros avaliados em *L. sativa* nas concentrações de 1600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25mg/L. A concentração de 12,5mg/L reduziu o IVG, CR e CA.

Na espécie *A. cepa*, os tratamentos de EDM e EDV reduziram os índices de % germinação, IVG e CR nas concentrações de 1600, 800 e 400mg/L. Enquanto a concentração de 200mg/L de EDM reduziu o CR e a mesma de EDV reduziu a % de germinação, o IVG e o CR, este último parâmetro também reduzido na concentração de 100mg/L de EDV. A plumbagina reduziu todos os índices avaliados em *A. cepa* (% germinação, IVG e CR) em todas as concentrações ensaiadas (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5mg/L).

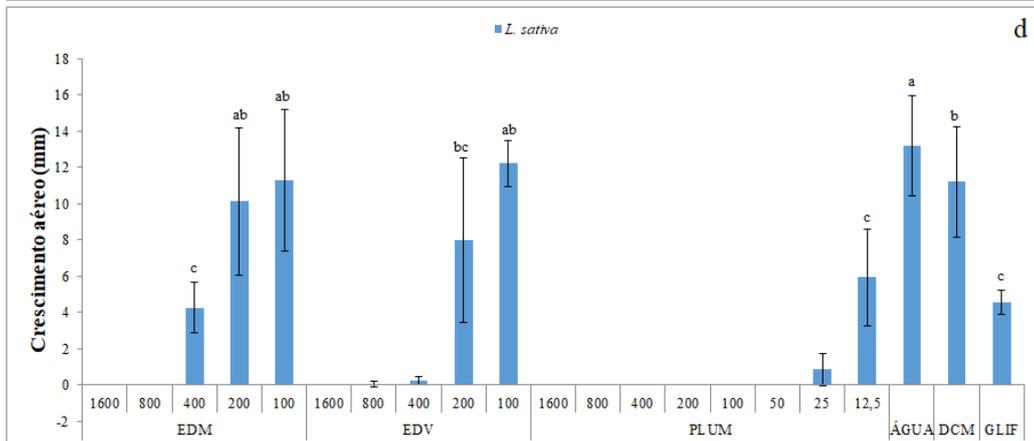
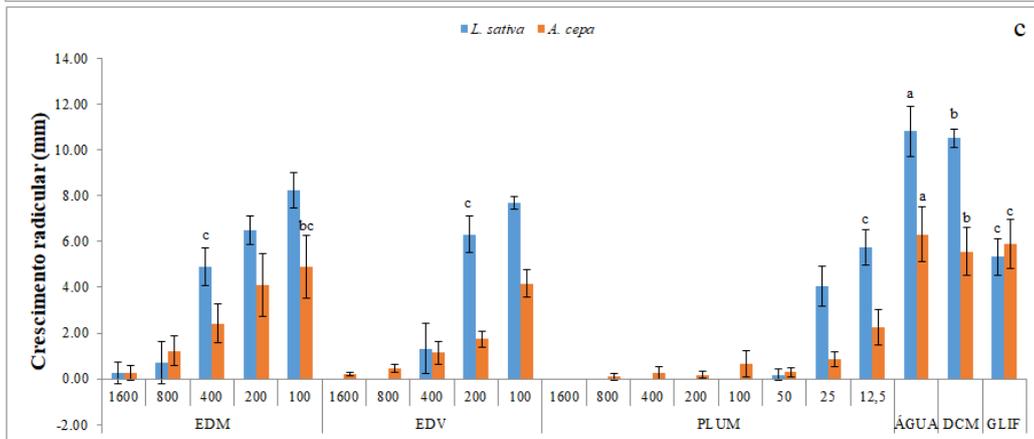
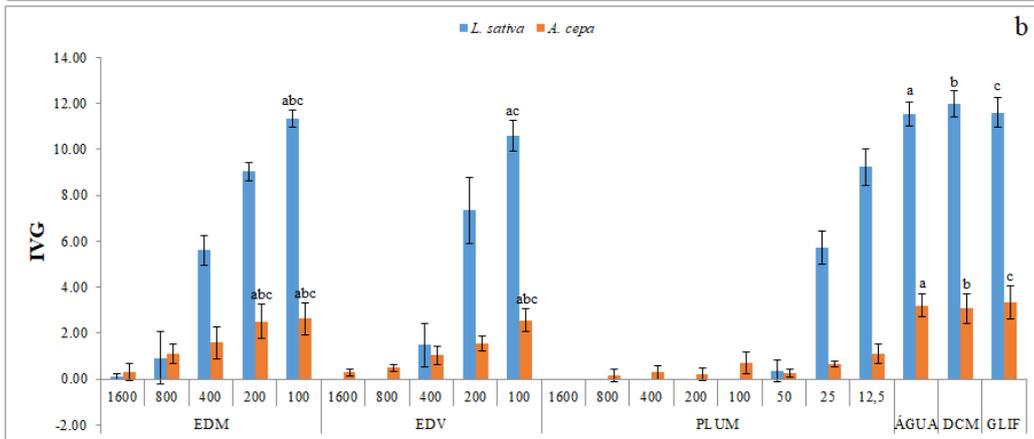
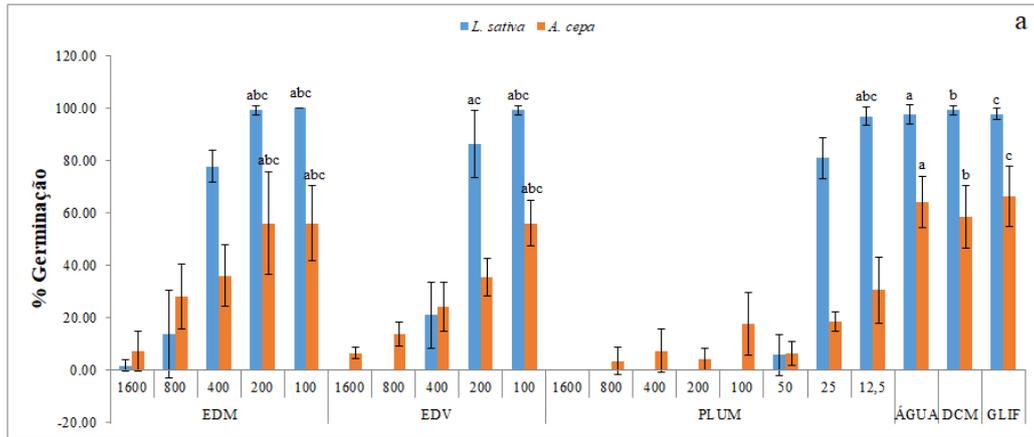


Figura 9 - Porcentagem de germinação (a), Índice de velocidade de germinação (b), Crescimento radicular (c) e Crescimento aéreo (d) de sementes de alface e cebola tratadas no método direto com diferentes concentrações dos extratos de *D. muscipula* morta (EDM) e *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), água (ÁGUA), diclorometano (DCM) e glifosato (GLIF). Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com água (H<sub>2</sub>O), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente diclorometano (DCM), e as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle positivo glifosato (GLIF), de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.

Durante a condução do experimento foram observadas algumas anormalidades morfológicas nas plântulas de *L. sativa* e *A. cepa*, germinadas nos métodos direto e indireto. Além de inibir o alongamento da radícula e do hipocótilo, as raízes que eclodiram nas maiores concentrações em todos os tratamentos foram mais espessas e de coloração escurecida conforme mostrado na Figura 10.

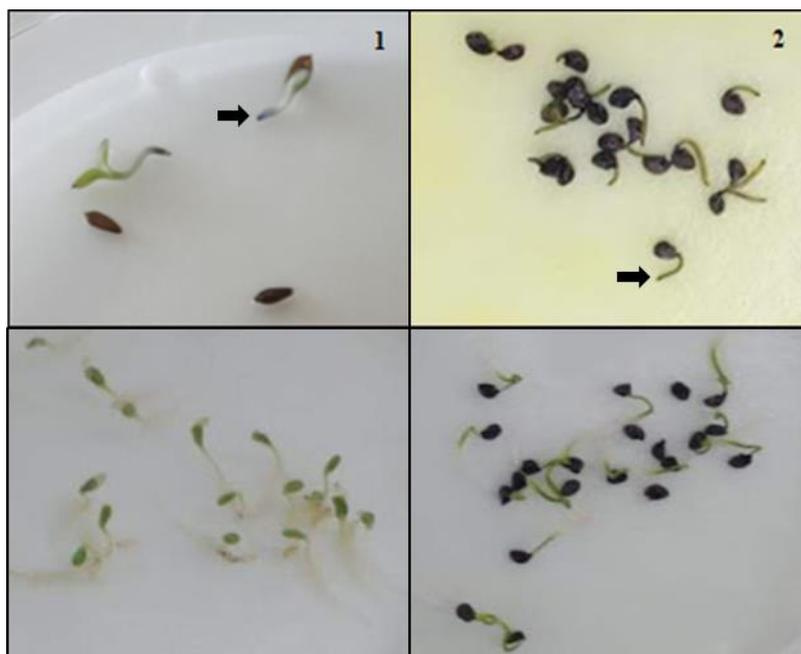


Figura 10 - Plântulas de *L. sativa* (1) e *A. cepa* (2) com meristemas apicais escurecidos (setas) no tratamento com a plumbagina no método indireto, acompanhados por plântulas desenvolvidas no controle negativo, água.

#### 5.4. Citogenotoxicidade em *L. sativa*

Para as análises de citogenotoxicidade foram utilizados ensaios microscópicos para avaliar o índice mitótico (IM), as alterações cromossômicas (AC), as alterações

nucleares (AN) e a frequência de micronúcleos (MNC). Conjuntamente, as frequências de cada tipo de AC induzidas foram contabilizadas, sendo elas: cromossomo perdido (PER), pegajoso (PEG), C-metáfase (CMET), ponte cromossômica (PON) e atraso (ATRA).

Dois métodos foram utilizados para a germinação das sementes visto que alguns tratamentos apresentaram elevada atividade fitotóxica, impedindo completamente a obtenção de raízes para as análises citogenéticas. No método direto (MD), as sementes foram germinadas em contato com o agente tóxico desde o início do experimento, no caso, em contato direto com os extratos de *D. muscipula* (EDM e EDV) e sua substância majoritária, plumbagina. No método indireto (MI), primeiro as raízes foram obtidas com a germinação das sementes em água e posteriormente foram transferidas para as placas de Petri contendo o tratamento com a plumbagina em diferentes concentrações.

A análise das células meristemáticas de *L. sativa* tratadas no MD mostrou que os tratamentos de 400 mg/L de EDM e EDV causaram reduções no IM similares ao encontrado para o controle positivo, glifosato (Figura 11). As taxas de AC observadas nos tratamentos EDM 100, EDV 200, EDV 100 e PLUM 25 foram superiores as alterações induzidas no tratamento com glifosato. No tratamento EDV 100, por exemplo, foram observadas alterações dos tipos MNC, PER, PEG e CMET, maior diversidade de alterações em um mesmo tratamento. A alteração cromossômica do tipo PEG foi a mais comum aos tratamentos aplicados no MD em *L. sativa* (Figura 11).

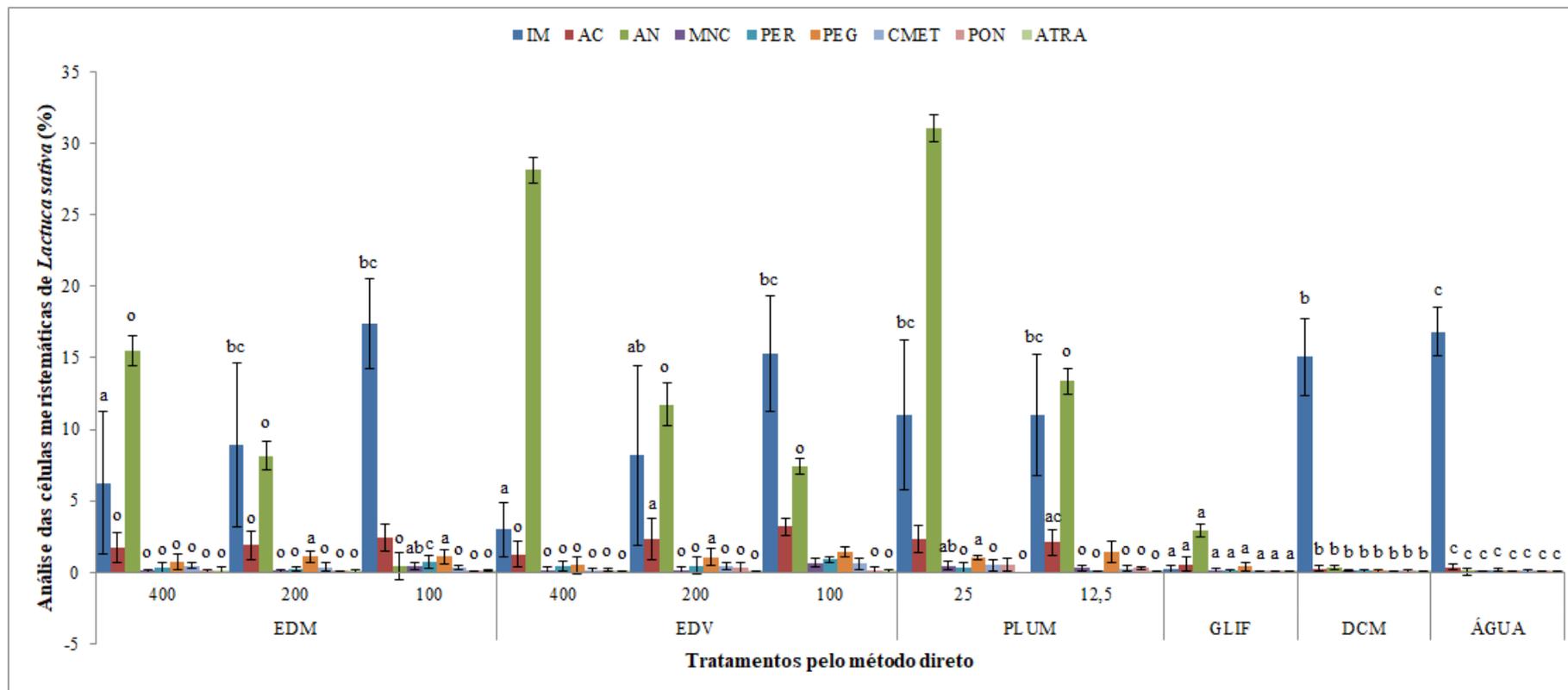


Figura 11 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *L. sativa* obtidas pelo método direto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P > 0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.

Foram observados aumentos nos índices da variável AN nos tratamentos PLUM 25 e EDV 400 nas células meristemáticas de raízes da *L. sativa*, tratadas no método direto (Figura 11). Não foi possível observar os efeitos das concentrações de 1600 e 800 mg/L dos tratamentos com EDM e EDV e 50 mg/L de PLUM em virtude da ausência de raízes para a análise.

O tratamento com a plumbagina no MI ocasionou reduções estatisticamente diferentes do controle positivo, glifosato, no IM de *L. sativa* em todas as concentrações avaliadas. Promovendo também, em todas as concentrações, um aumento nas AC observadas, especialmente PEG, após 48 horas de exposição à substância. Enquanto as concentrações de 1600 e 200 mg/L de plumbagina foram responsáveis por aumentar a incidência de AN observadas (Figura 12).

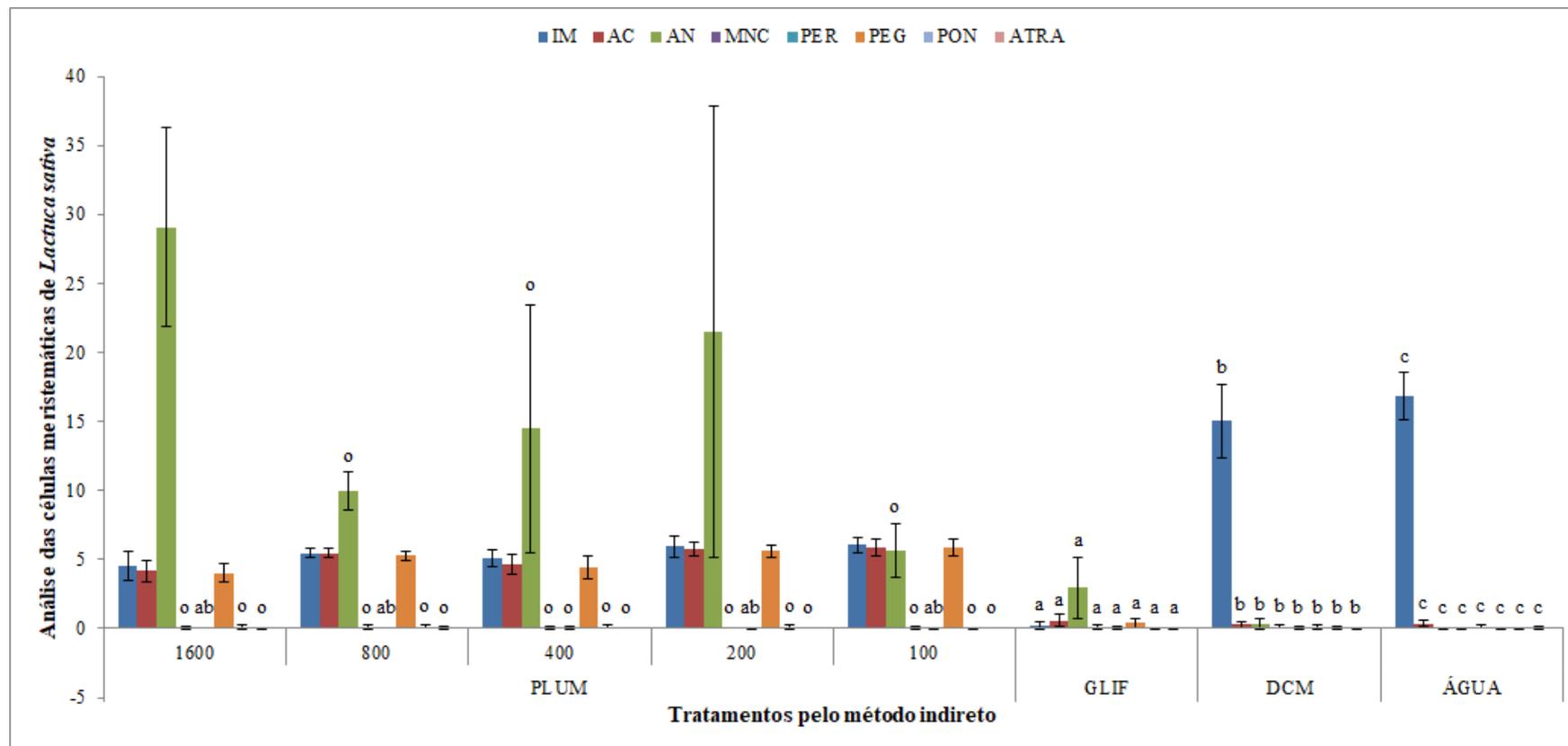


Figura 12 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *L. sativa* obtidas pelo método indireto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P > 0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.

Foram observadas manifestações de apoptose nas células meristemáticas de *L. sativa*, como ilustrado na Figura 13A e 13B. A Alteração Cromossômica com maior incidência de observação nas células meristemáticas de alface em todos os tratamentos foi cromossomo pegajoso (Figura 13D).

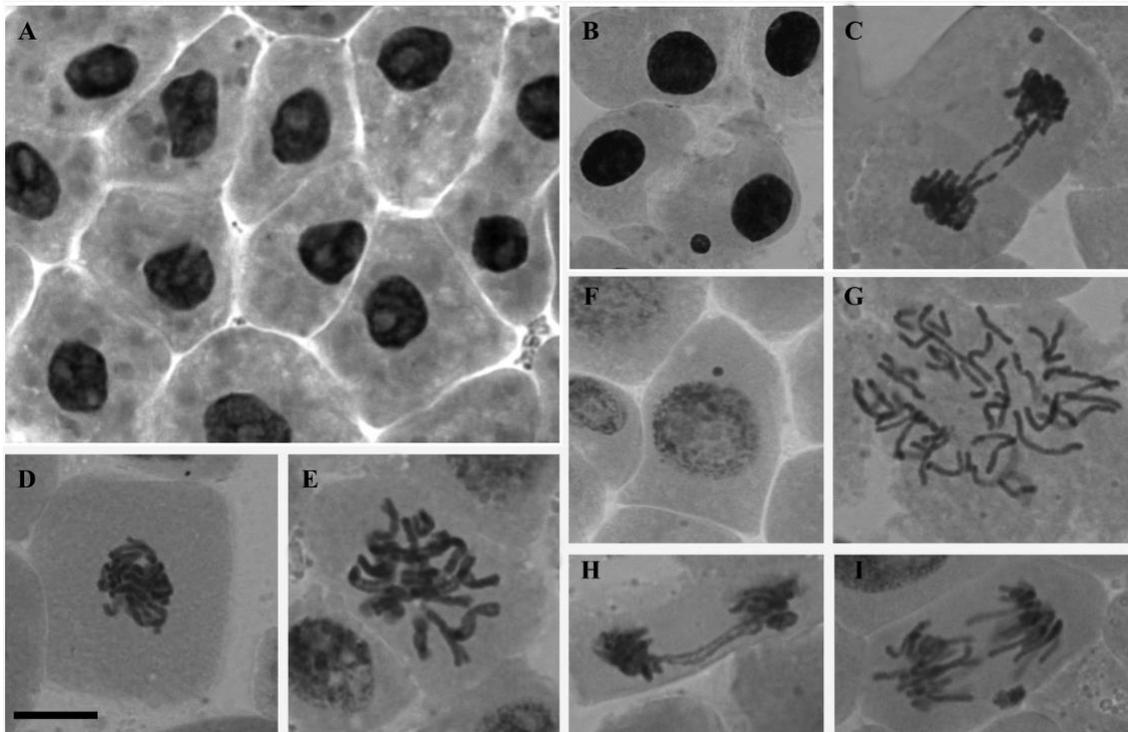


Figura 13 - Células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com EDM, EDV e PLUM. (A) Núcleos condensados, (B) Núcleos condensados com micronúcleo, (C) Telófase com ponte e micronúcleo, (D) Cromossomo pegajoso, (E) C-Metáfase, (F) Micronúcleo, (G) C-Metáfase poliploide, (H) Anáfase com ponte dupla, (I) Anáfase com atraso e perda cromossômica. Barra: 10  $\mu$ m.

## 5.6. Citotoxicidade em *A. cepa*

As análises das células meristemáticas de *A. cepa* tratadas no MD mostraram que os tratamentos EDM 200, EDM 400, PLUM 25, EDM 800, EDV 400 e EDV 200 mg/L causaram reduções no IM similares estatisticamente, segundo Dunnet 0,05%, ao encontrado para o controle positivo, glifosato. Foi observado um aumento no índice de AN, estatisticamente similares aos efeitos do glifosato, nos tratamentos PLUM 25, PLUM 12,5 e EDV 200 mg/L. Já as induções de AN nos tratamentos EDV 400, EDV 800 e EDM 800 mg/L foram, estatisticamente, superiores ao controle positivo (Figura 14).

Com exceção da concentração 400 mg/L na variável AC, todas as concentrações de plumbagina avaliadas no MI foram responsáveis pela redução do IM, aumento de AC e aumento nas AN (Figura 15).

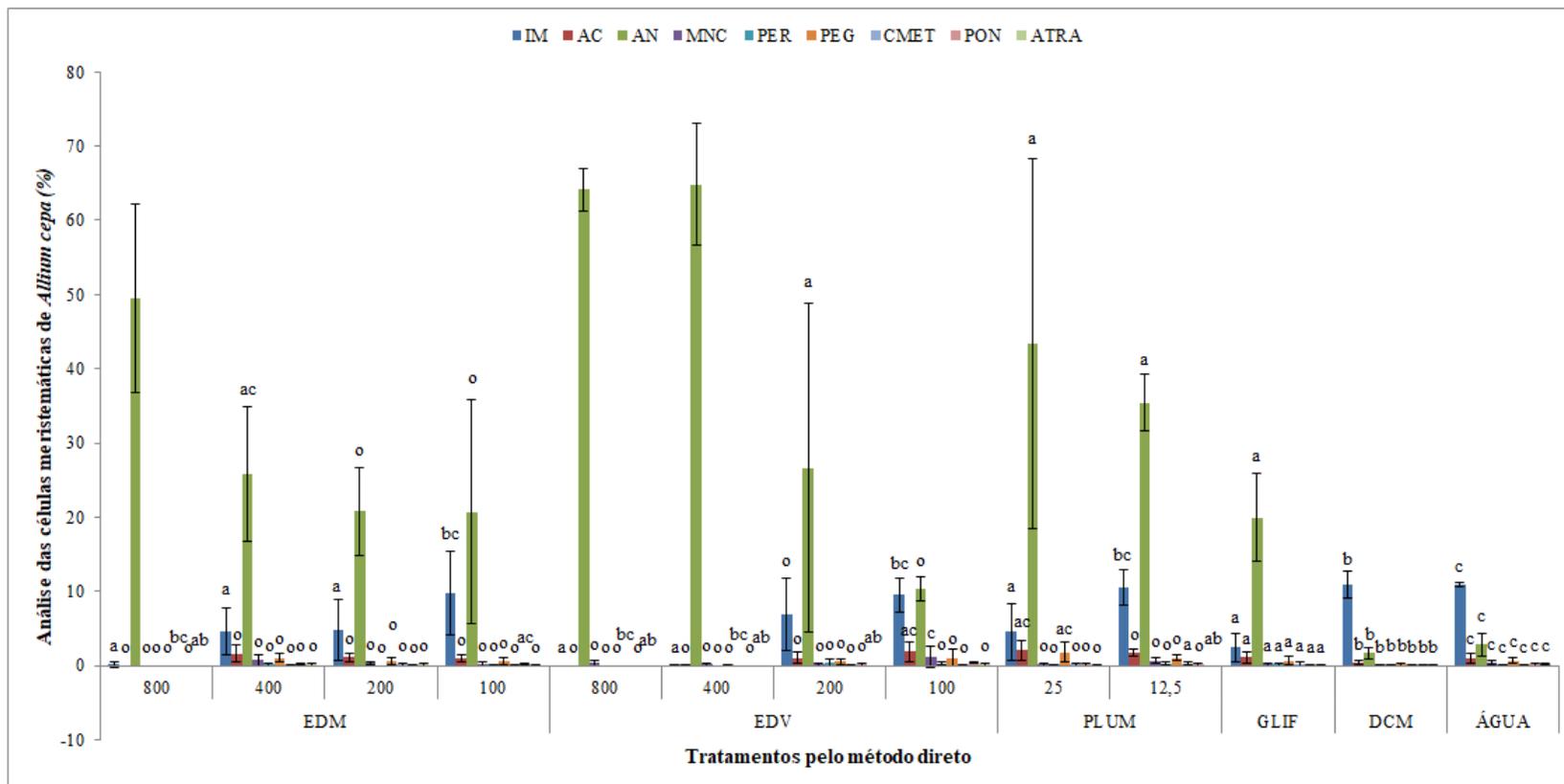


Figura 14 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *A. cepa* obtidas pelo método direto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P > 0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.

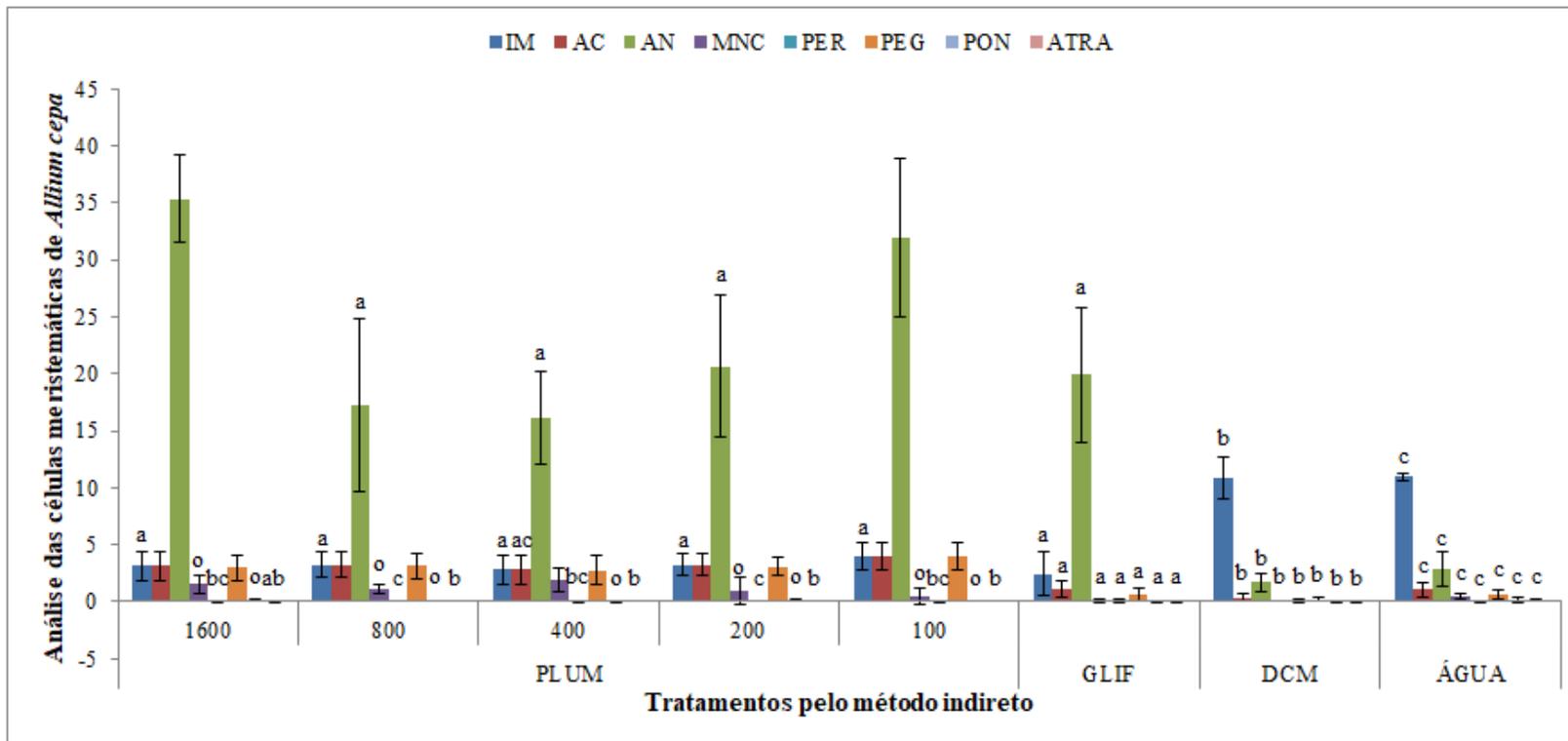


Figura 15 - Citogenotoxicidade dos extratos obtidos a partir de *D. muscipula* morta (EDM), *D. muscipula* viva (EDV), plumbagina (PLUM), glifosato (GLIF), diclorometano (DCM) e água (ÁGUA), testados em células meristemáticas de *A. cepa* obtidas pelo método indireto. Os números no eixo horizontal da figura representam as concentrações em mg/L, avaliadas dos tratamentos. As médias seguidas pela letra “a” são estatisticamente idênticas ao controle positivo (GLIF), as médias seguidas de “b” são estatisticamente idênticas ao controle negativo com solvente (DCM), as médias seguidas de “c” são estatisticamente idênticas ao controle negativo (ÁGUA), e as médias seguidas por “o” são idênticas a todos os controles, de acordo com o teste de Dunnett ( $P>0,05$ ), e médias com ausência de letras são estatisticamente diferentes de todos os controles.

A alteração cromossômica com maior incidência de observação nas células meristemáticas de *A. cepa* foi cromossomo pegajoso (PEG), assim como o encontrado para a *L. sativa* (Figura 15). Alterações nucleares tipo célula binucleada (16F), broto celular (16C), micronúcleo, (16B) e núcleo condensado (16B, 16C), assim como células em processo de morte celular por apoptose (16J, 16K, 16L) também foram observadas.

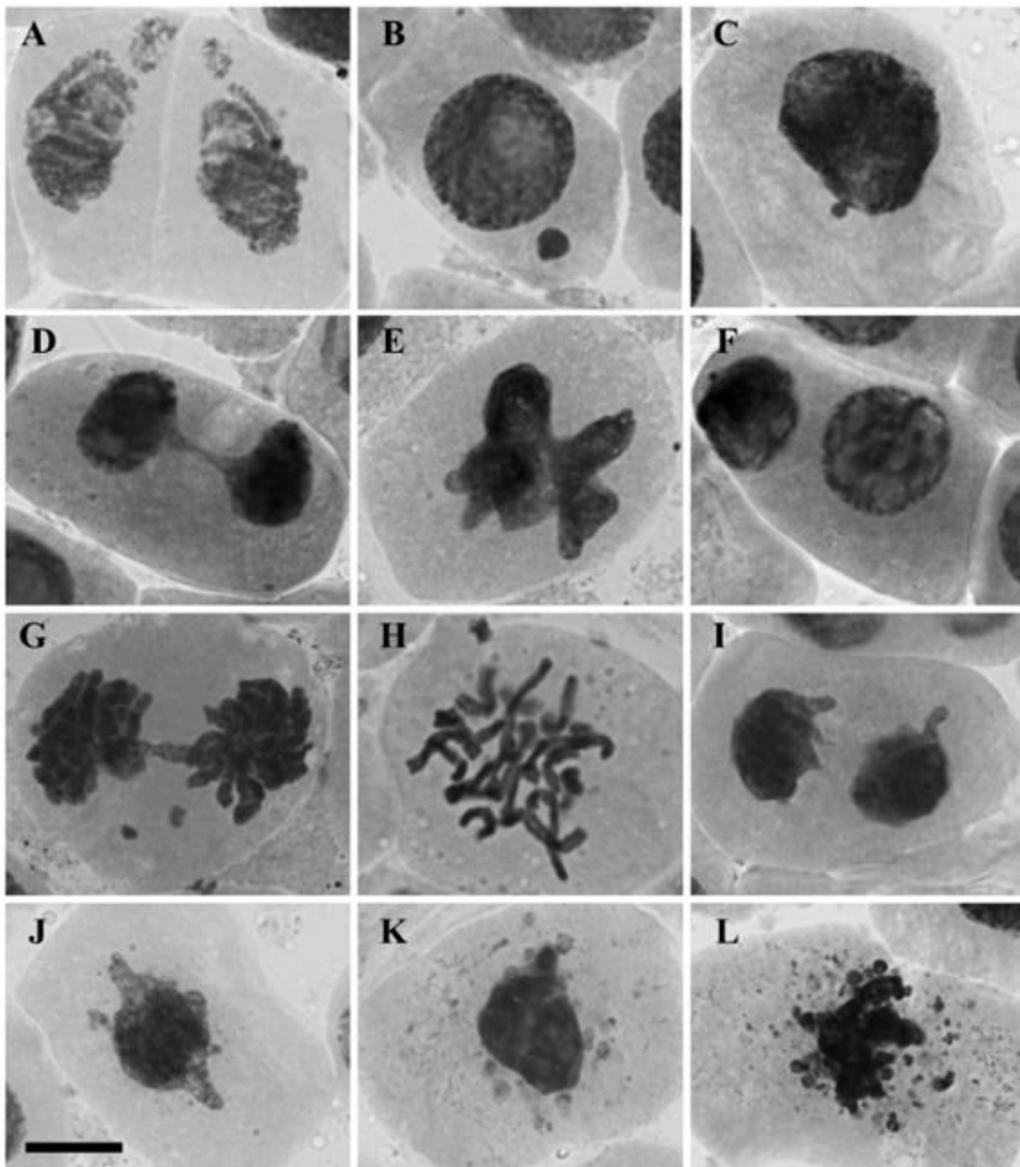


Figura 16 - Células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com EDM, EDV e PLUM. (A) Telófase com perda cromossômica, (B) Núcleo condensado com micronúcleo, (C) Núcleo condensado com broto celular, (D) Telófase com comunicação celular, (E) Cromossomo pegajoso, (F) Célula binucleada com núcleo condensado, (G) Anáfase com ponte e perda cromossômica, (H) C-metáfase, (I) Anáfase com formação de brotos, (J) Cromossomo pegajoso com início de apoptose, (K) Apoptose, (L) Apoptose. Barra: 10  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

A análise de fitotoxicidade dos extratos e da plumbagina buscou avaliar a capacidade destes compostos em induzir alterações que possam comprometer a sobrevivência de modelos vegetais. A elevada redução dos parâmetros de porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e crescimento aéreo observado na *L. sativa* em resposta ao tratamento com a substância isolada, confirmam o potencial alelopático dos extratos de *D. muscipula* e da plumbagina. As concentrações de 1600 mg/L e 800 mg/L do EDV foram responsáveis pela não germinação de 100% das sementes de *L. sativa*, sendo que as mesmas concentrações do EDM apresentaram 1,6% e 13,6% de germinação, respectivamente. Enquanto o glifosato a 0,05% (500 mg/L) apresentou efeito idêntico ao tratamento com a água, tendo uma taxa de germinação de 97,6% em *L. sativa*. As sementes de *L. sativa* quando tratadas com as diluições de 1600, 800, 400, 200 e 100 mg/L de plumbagina apresentaram ausência completa de germinação. A diluição de 50 mg/L reduziu para 5,6% a germinação e 25 mg/L para 80,8% (Figura 9a).

Para o modelo *A. cepa*, o glifosato expressou uma taxa de germinação igual a 66,4%, ligeiramente maior que a água, com 64%. As sementes de *A. cepa* apresentaram 7,2% e 28% de germinação nas duas maiores concentrações de EDM, enquanto as mesmas concentrações de EDV resultaram em 6,4% e 13,6% de germinação (Figura 9a). A concentração de 400 mg/L dos dois extratos também interferiu na porcentagem de germinação em ambas as espécies modelo. A concentração de 200 mg/L do EDV reduziu a porcentagem de germinação de *A. cepa* para 35,2%. No tratamento com plumbagina, as sementes de *A. cepa* apresentaram redução nas taxas de germinação estatisticamente diferentes dos controles em todas as concentrações estudadas. A concentração de 1600 mg/L inibiu completamente a germinação, enquanto a 800 mg/L germinaram apenas 3,2% das sementes, 400 mg/L (7,2%), 200 mg/L (4%), 100 mg/L (17,6%), 50 mg/L (6,4%), 25 mg/L (18,4%) e 12,5 mg/L (30,4%) (Figura 9a).

Compostos fenólicos, como a plumbagina, estão entre os principais grupos de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, entre eles destacam-se os fenóis naturais timol e carvacrol por apresentarem atividade fitotóxica (TAIZ E ZEIGER, 2013; PINHEIRO et al., 2015). Utilizando cloroacetato de sódio, sob refluxo, seguido

por acidificação, Alves et al. (2018) sintetizaram os ácidos timoxiacético e carvacroxiacético, análogos dos herbicidas 2,4-D e MCPA isentos de cloro. Os fenóis e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos foram testados no desenvolvimento inicial de sementes de *L. sativa* e *Sorghum bicolor* (sorgo). A concentração de 3 mmol L<sup>-1</sup> de carvacrol ocasionou aproximadamente 40% de inibição da germinação e 56% do índice de velocidade de germinação em *S. bicolor*, sendo mais eficiente que o herbicida comercial testado. Ao contrário do presente estudo, o efeito tóxico do ácido timoxiacético foi seletivo, semelhante ao do herbicida comercial 2,4-D, enquanto os tratamentos com EDM, EDV e plumbagina foram mais eficientes que o glifosato em inibir o desenvolvimento inicial de *L. sativa* e *A. cepa*.

A redução do CR promovida pelo controle positivo, glifosato, foi de 50,74%, comparado ao observado para o controle negativo com água. Já nas plântulas de alface tratadas com as diferentes concentrações do EDM, a redução variou de 97,7 a 23,89%, sendo que as concentrações de 1600 mg/L e 800 mg/L com melhores resultados. A redução observada para o tratamento com EDV foi mais promissora, com reduções de 100 a 87,69% entre as concentrações de 1600, 800 e 400 mg/L. Enquanto o tratamento com a PLUM, nas oito concentrações estudadas (1600 a 12,5 mg/L), foi responsável por reduções entre 100 a 46% no CR em alface. Resultados similares foram observados nas plântulas de cebola, porém em menores porcentagens (Figura 9c).

Gonçalves et al. (2009a) visualizaram a inibição da expansão radicular nas poucas sementes germinadas nas maiores concentrações dos extratos de *D. lusitanicum* e redução significativa no comprimento radicular, aéreo e na biomassa produzida. Assim como o observado no presente estudo, a espécie *A. cepa* estudada foi menos afetada pelo tratamento com os extratos quando comparado à espécie *L. sativa*. Segundo Silveira et al., (2017), ao compararem os efeitos tóxicos do Cádmio em *L. sativa* e *A. cepa* num período de 120h, *A. cepa* não apresentou desenvolvimento da parte aérea nem mesmo no controle, sendo atribuído sua menor sensibilidade à sua característica fisiológica, uma vez que seu desenvolvimento seria mais lento que o da *L. sativa*. Corroborando com os estudos realizados por Tigre et al. (2012) e Silveira et al. (2017), *L. sativa* foi mais eficiente em demonstrar a fitotoxicidade dos extratos EDM e EDV,

bem como da própria plumbagina, devido sua maior sensibilidade e rapidez no desenvolvimento inicial.

Importante ressaltar que as plantas mortas, que seriam descartadas, apresentaram rendimento suficiente para a condução dos testes assim como um elevado teor de plumbagina (53,13% do conteúdo). Já as plantas vivas, que não apresentaram interrupção na síntese de metabolitos, apresentaram concentração de plumbagina superiores chegando a 89,71% no EDV. A concentração de 89,71% de plumbagina no EDV pode explicar os resultados superiores de fitotoxicidade encontrados para este tratamento, quando comparados ao que utilizou o EDM, que possuía apenas 53,13%.

Os parâmetros de crescimento radicular e aéreo dos modelos vegetais tratados com EDM, EDV e PLUM mostraram-se equivalentes ao encontrado para o herbicida glifosato, que atua bloqueando o desenvolvimento das plântulas. O glifosato, N-fosfonometil glicina, é um herbicida (disponível comercialmente como Roundup) organofosforado não-seletivo, sistêmico e de atuação pós-emergente capaz de inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) que catalisa a reação do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato. Essa inibição evita a síntese de três aminoácidos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina, precursores de produtos como lignina, antocianinas, compostos fenólicos e promotores e inibidores de crescimento (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). A fenilalanina é uma substância intermediária na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos que atuam como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, e também como suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A estimulação do crescimento radicular foi observada nas menores concentrações, de 100 mg/L, dos extratos com a planta viva e morta no modelo biológico alface. No entanto, esse crescimento não envolve simplesmente a proliferação celular, mas também uma função de alongamento das células comum para pequenas concentrações de substâncias auxínicas. Que agem proporcionando o crescimento vegetal a partir do afrouxamento da parede celular pelas proteínas expansinas no

processo de diferenciação (HARASHIMA E SCHNITTGER, 2010; TAIZ E ZEIGER, 2013).

As anormalidades morfológicas nas plântulas de *L. sativa* e *A. cepa*, com indícios de oxidação, também foram relatadas por Gonçalves et al. (2009a) no tratamento de *L. sativa* e trigo com extratos da planta carnívora *D. lusitanicum*, evidenciando o efeito tóxico dos extratos contendo plumbagina, bem como da própria substância.

O potencial que uma determinada substância tem em inibir ou aumentar a proliferação celular pode ser avaliado através dos valores de índices mitóticos. O IM é uma variável muito plástica uma vez que, se aumentada pode permitir uma maior visualização no número de AC e sua diminuição pode ser desencadeada através do mecanismo de defesa da célula aos danos celulares provocados pelo ambiente (PINHEIRO et al. 2015, ALVES et al, 2017). Com isso, a diminuição do IM nas maiores concentrações dos tratamentos EDM, EDV e PLUM, significa que existe um menor número de células em processo de divisão celular devido às alterações proporcionadas pelos compostos químicos presentes nos extratos. Em resposta a citotoxicidade dos tratamentos nas plantas modelos, foram observadas reduções da taxa de germinação, do crescimento radicular e do crescimento aéreo, apenas em *L. sativa*, variáveis que atestam a fitotoxicidade dos compostos ensaiados.

Células de *Nicotiana tabacum* cv. amarelo brilhante -2 (BY-2) tratadas com plumbagina apresentaram citotoxicidade em concentrações acima de 50 µg/L. As células apresentaram redução da viabilidade celular com forte inibição do crescimento, diminuição no IM, elevada condensação da cromatina, alterações cromossômicas do tipo ponte e C-metáfases. Resultados que corroboram a citotoxicidade da plumbagina observada para *L. sativa* acima de 100 mg/L e *A. cepa* acima de 25 mg/L, no presente estudo. A morte celular por apoptose, induzida pela geração de espécies reativas de oxigênio, após o tratamento com plumbagina é bem documentada (INBARAJ e CHIGNELL, 2004; POWOLNY e SINGH, 2008; KUMAR et al., 2009; KLAUS et al., 2010). Isto pôde ser observada através de sondas fluorescentes de dihidroetidio, confirmando o mecanismo que desencadeia a morte celular programada por apoptose induzida pela naftoquinona plumbagina (BABULA et al, 2009).

No modelo vegetal *L. sativa* foi possível visualizar um maior número de diluições promovendo um aumento no índice de AC, quando comparado a *A. cepa*. O tratamento EDV 100 mg/L no MD, por exemplo, foi responsável por uma taxa de AC 5,48 vezes o valor de AC promovidas pelo glifosato. No MI esse valor chegou a ser 10,20 vezes o valor de AC encontradas no glifosato no tratamento PLUM 100. A alteração cromossômica com maior incidência foi à aderência para ambos os sistemas testes. Caracteriza pela união dos cromossomos, seu efeito irreversível pode levar a morte celular (ARAGÃO et al. 2015; BERNARDES et al 2015, ALVES et al. 2017). É uma alteração que pode indicar diferentes mecanismos de ação simultaneamente, sendo: clastogênico, aneugênico, e/ou epigenético (FREITAS et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

As alterações nucleares são mudanças morfológicas e bioquímicas ocorridas no núcleo celular podendo ser expressas nas formas de micronúcleo, broto nuclear, célula binucleada e núcleo condensado. (FERNANDES et al., 2007; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ALVES et al., 2018). Andrade-Vieira et al. (2011 e 2014) explicam que, em termos citológicos, a morte celular pode ser caracterizada pela presença de núcleo condensado, representado no estudo como AN. Em *A. cepa* foram identificados um número maior de tratamentos promovendo AN, sendo o EDV 400 responsável por 3,26 vezes a taxa de alterações induzidas pelo glifosato no MD e PLUM 1600 mg/L com 1,77 vezes o glifosato no MI. A formação de micronúcleos observado no tratamento EDV 100 mg/L, em ambos os modelos vegetais, está relacionada a fragmentos acêntricos ou retardatários dos cromossomos sendo excluídos do núcleo propriamente dito durante a mitose (MA, et al., 1995).

Vários mecanismos de ação foram identificados para a plumbagina utilizando diferentes modelos biológicos. Fujii et al. (1992) e Kawiak et al. (2007) relataram a formação de um “complexo clivável” reversível entre a Topoisomerase II e a plumbagina, resultando na fragmentação do DNA. Segundo Acharya et al. (2008), a plumbagina é responsável por inibir a polimerização da tubulina em microtúbulos em estudos *in vitro* utilizando células de carcinoma do epitélio do pulmão. Gonçalves et al. (2010) observaram a inibição do ciclo celular na fase G2 da mitose até a indução de apoptose em células do adenocarcinoma cervical humano (HeLa). Segundo Seshadri et

al. (2011) a plumbagina induz a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos com a ativação da enzima caspase-3, resultado do estresse oxidativo que as mitocôndrias sofrem pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linfócitos do sangue periférico humano.

Baseado nos resultados encontrados todos os extratos utilizados apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células das raízes de *L. sativa* e *A. cepa*. Sendo que, os efeitos foram mais pronunciados em EDV devido a maior quantidade de plumbagina.

A análise da frequência dos diferentes tipos de AC que ocorreram nas células meristemáticas da *L. sativa* e *A. cepa* pode indicar o mecanismo de ação dos extratos e da plumbagina. A maior incidência de aderência cromossômica e cromossomos perdidos indicaram um efeito aneugênico dos tratamentos EDM, EDV, PLUM e GLIFOSATO. Diferente dos efeitos clastogênicos relatados para a plumbagina em células de tabaco (BABULA et al. (2009) e corroborando o efeito aneugênico do glifosato, investigado em células de *A. cepa* por Rank e Nielsen (1994). Entretanto, a aderência pode ter sido originada por efeitos clastogênicos que alteraram as propriedades físico-químicas do DNA (FREITAS et al., 2016; SANTOS et al., 2018) ou por alterações epigenéticas, com menores sinais de fosforilação da histona 3 (FREITAS et al., 2016).

As maiores induções de danos no ciclo celular de *L. sativa* e *A. cepa* pelo tratamento com plumbagina corroboraram a hipótese dela ter causado a morte prematura das plantas carnívoras da espécie *D. muscipula* no seu cultivo *in vitro*. A cultura de tecidos possui uma elevada aplicabilidade, além de uma solução para salvar espécies ameaçadas, pode ser utilizada como fonte alternativa para fins farmacológicos. Além da rápida multiplicação de biomassa vegetal, também cria a possibilidade de se aumentar o conteúdo de metabólitos secundários sintetizados com a aplicação de precursores biossintéticos (VERPOORTE et al., 1999) ou a aplicação de elicitores que induzem respostas de defesa nas plantas (NAHÁLKA et al., 1996; HOOK, 2001; KROLICKA et al., 2008).

A atividade antibacteriana de extratos de *D. muscipula*, por exemplo, foi aumentada com a utilização de ácido jasmônico como elicitador, sendo responsável por aumentar em 2,6 vezes o nível de plumbagina, comparado ao controle (KROLICKA et al., 2008). Pesquisas com a utilização de elicitores em espécies da família Droseraceae também estão sendo conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Viçosa- Campus Rio Paranaíba (Dados não publicados). Assim, baseando-se nos resultados encontrados de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos diclorometanólicos de *D. muscipula* em *L. sativa* e *A. cepa*, espera-se ampliar o estudo do efeito alelopático do extrato, melhorando seu potencial para utilização no controle de plantas daninhas.

## 7. CONCLUSÃO

As porcentagens de plumbagina encontradas nos extratos foram superiores aos demais constituintes, indicando-a como constituinte majoritário com 36,86% no extrato do meio de cultura da planta morta (EMDM), 54,12% no extrato do meio de cultura da planta viva (EMDV), 53,13% no extrato da planta morta (EDM) e 89,71% no extrato da planta viva (EDV). Indicando que a substância amarela foi naturalmente sintetizada pelas plantas e em função do cultivo *in vitro* ficou acumulada, fornecendo assim, um ambiente propício para sua autointoxicação.

A elevada fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da plumbagina a indicam como substância aleloquímica nos extratos, fato confirmado devido à observação de maiores efeitos em extratos que a apresentaram em maiores concentrações.

Reduções na germinação, crescimento radicular e índice mitótico foram observados nas plântulas de *L. sativa* e *A. cepa* tratadas com os extratos de *D. muscipula* viva e morta, comparado ao controle positivo, glifosato, indicando seu potencial fitotóxico e citotóxico. As concentrações de 1600, 800 e 400 mg/L dos EDV e EDM se mostram boas opções no controle pré-emergente de espécies modelos. Enquanto as concentrações de 800, 400 e 200 mg/L apresentaram alterações no ciclo celular que podem comprometer a integridade dos dois modelos vegetais ensaiados.

Reduções no Índice Mitótico acompanhados de aumento de Alterações cromossômicas e nucleares nos meristemas radiculares de *L. sativa* e *A. cepa* confirmam a capacidade dos extratos e da plumbagina em causar a morte celular em espécies vegetais. A redução no Índice mitótico, conforme dose-dependência, demonstra o efeito citotóxico dos tratamentos, EDM, EDV e PLUM, que também apresentaram efeito genotóxico devido ao aumento nas alterações nucleares e cromossômicas. Dentre elas, as maiores visualizações de cromossomos pegajosos e perdidos indicam uma ação aneugênica dos compostos.

Os resultados da investigação das atividades fitotóxicas, citotóxicas e genotóxicas dos tratamentos EDM, EDV e PLUM contribuíram para identificar a causa da morte prematura de *Dionaea muscipula in vitro* e sugerem a possibilidade de serem desenvolvidos produtos ecologicamente corretos e aceitáveis para o manejo de plantas daninhas no sistema agrícola.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, B. R; BHATTACHARYYA, B; CHAKRABARTI, G. The natural naphthoquinone plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding. **Biochemistry**, v. 47, p. 7838-7845, 2008.

AHMAD, A; BANERJEE, S; WANG, Z; KONG, D; SARKAR, F. H. Plumbagin induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF -  $\kappa$ B and Bcl - 2, **Journal of Cellular Biochemistry**, v.105, p. 1461-1471, 2008.

ALENCAR, C. Relatório de voto pela rejeição do PL 6.299/2002, e de seus apensados, 2018. Disponível em: <  
[http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop\\_mostrarintegra?codteor=1660415&filename=VTS+2+PL629902+%3D%3E+PL+6299/2002](http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1660415&filename=VTS+2+PL629902+%3D%3E+PL+6299/2002)> Acessado em: 25 set. 2018.

ALMEIDA, M. D; CAVENDISH, T. A; BUENO, P. C; ERVILHA, I. C; GREGÓRIO, L. S; KANASHIRO, N. B. O; ROHLFS, D. B; CARMO, T. F. M. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do projeto de Lei nº 3.200/2015, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33-7, p. 1-11, 2017.

ALMEIDA, S. D. B; COSTA, E. A. D; GOMES, M. A. F; LUCHINI, L. C; SPADOTTO, C. A; MATALLO, M. B. Sorção de Triazinas em Solos Tropicais e pré seleção para recomendação de uso na região de Ubatuba. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 17-22, 2006.

ALVES, T. A. Prospecção da toxicidade de fenóis naturais e seus respectivos derivados ácidos fenoxiacéticos em bioensaios vegetais. Dissertação apresentada ao Programa de Genética e Melhoramento UFES-CCAEE, área de Biotecnologia, 2017.

ALVES, T. A; PINHEIRO, P. F; PRAÇA-FONTES, M. M; ANDRADE-VIEIRA, L. F; CORRÊA, K. B; ALVES, T. A; DA CRUZ, F. A; LACERDA JÚNIOR, V; FERREIRA, A; SOARES, T. C. B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial crops and products**, v. 114, p. 59-67, 2018.

ANDRADE, L. F; DAVIDE, L. C; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F; GEDRAITE, L. S; CAMPOS, J. M. S; DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotox Environ Saf**, v. 74, p. 882-888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F; BOTELHO, C.M; PALMIERI, M.J; LAVIOLA, B.G; PRAÇA-FONTES, M.M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays, **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Impresso), v. 86, p. 373-382, 2014.

ANGIONI, A; BARRA, A; CORONEO, V; DESSI, S; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers, **J. Agric. Food Chem**, v.54, p. 4364-4370, 2006.

ARAGÃO, F. B; PALMIERI, M. J; FERREIRA, A; COSTA, A. V; QUEIROZ, V. T; PINHEIRO, P. F; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B; QUEIROZ, V. T; FERREIRA, A; COSTA, A. V; PINHEIRO, P. F; CARRIJO, T. T; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 65, p. 435-443, 2017.

BABULA, P; ADAM, V; KIZEK, R; SLADKÝ, Z; LADISLAV, H. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 330-337, 2009.

BANASIUK, R; KAWIAK, A; KRÓLICKA, A. In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. **BioTechnologia**, v. 93, p. 87-96, 2012.

BENASSI, J. C. O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BARBOSA, E.G; PIVELLO, V.R; MEIRELLES, S.T. Allelopathic Evidence in *Brachiaria decumbens* and its Potential to Invade the Brazilian Cerrados. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.5, p.825-831. 2008.

BARRUETO CID, L. P. B; J. B. TEIXEIRA. "Explante, meio nutritivo, luz e temperatura." Cultivo in vitro de plantas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 15-49, 2014.

BASTOS, B. O; DEOBALD, G. A; BRUN, T; PRÁ, V. A; JUNGES, E; KUHN, R. C; PINTO, A. K; MAZUTTI, M. A. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy, **Biotech**, v. 7-135, p. 1-9, 2017.

BENNET, R.N; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolism in plant defense – mechanisms. **New Phytol.**, v.127, p. 617-633, 1994.

BERNARDES, C. O; ZAGO, H. B; SOUZA, T. S; SILVA, S. F; CANAL, D., FERREIRA, A; FERREIRA, M. F. S. Effects of two chemotypes of *Psidium guajava* essential oils in *Spodoptera frugiperda*, CAPÍTULO III da Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2017.

- BERNARDES, P. M; ANDRADE-VIEIRA, L. F; ARAGÃO, F. B; FERREIRA, A; DA SILVA FERREIRA, M. F. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 207, 2015.
- BESSA, T; TERRONES, M.G.H; SANTOS, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Rev. Floresta Amb**, v. 17, p. 52-55, 2010.
- CARNEIRO, F. F; AUGUSTO, L. G. S; RIGOTTO, R. M; FRIEDRICH, K; BÚRIGO, A. C. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- CASTRO, F. A. V; MARIANI, D; PANEK, A. D; ELEUTHERIO, E. C. A; PEREIRA, M. D. Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**. v. 3, e3999, 2008.
- CHAN-BACAB, M. J; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat Prod Rep**, v. 18, p. 674–688. 2001.
- CHAPLA, T. E; CAMPOS, J. B. Allelopathic evidence in exotic guava (*Psidium guajava* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53-6, p. 1359-1362, 2010.
- COSTALONGA, S. A; BATITUCCI, M. C. P. Evaluation of the mutagenic effects of *Passiflora edulis* Sims (maracujá) tincture on the *Allium cepa* test system. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, p. 329-337, 2014.
- CROUCH, I. J; FINNIE, J. F; STADEN, J. V. Studies on the isolation of plumbagin from in vitro and in vivo grown *Drosera* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 21, p. 79-82, 1990.
- CRUZ, C. D. Programa GENES – Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética. **Genet. Mol. Biol.** v. 21, 1998.
- DAYAN, F. E; ROMAGNI, J. G; TELLEZ, A; RIMANDO, S; DUKE, S. Managing weeds with bio-synthesized products. **Pesticide Outlook**, v. 10, p. 185-188, 1999.
- DAYAN, F. E; ROMAGNI, J. G; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2079-2094, 2000.
- DUDAREVA, N; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scent. **Plant Physiol.**, v.122, p. 627-633, 2000.
- DUKE, S. O; DAYAN, F. E; ROMAGNI, J. G; RIMANDO, A. M. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000a.
- DUKE, S. O; DAYAN, F. E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. **In Am Chem Soc Symp Ser**, v. 1204, p. 79-92, 2015.

- DUKE, S. O; ROMAGNI, J. G; DAYA, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, p. 8-10, 2000b.
- DUKE, S. O; DAYAN, F. E; RIMANDO, K. K; SCHRADER, G; ALIOTTA, A; OLIVA, A; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management, **Weed Science**, v. 50, p. 138-151, 2002.
- DURGA, R; SRIDHAR, P; POLASA, H. Effects of plumbagin on antibiotic resistance in bacteria. **Indian J Med Res**, v. 91, p. 18–20, 1990.
- FATIMA, R. A; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two diferente pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, p. 81-91, 2006.
- FAGODIA, S; SINGH, H. P; BATISH, D; KOHLI, R. Phytotoxicity ad cytotoxicity of *Citrus aurantiifolia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral, **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 708-715, 2017.
- FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutag nicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista –Campus de Rio Claro, 2005.
- FERNANDES, T. C. C; MAZZEO, D. E. C; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pest. Biochem. Physiol.** v.88, p. 252–259, 2007.
- FISKESJ , G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 27 Set. 2018
- FORZZA, R. C. et al. (org.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil, v. 1, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- FUJII, N; YAMASHITA, Y; ARIMA, Y; NAGASHIMA, M; NAKANO, H. Induction of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by the Plant Naphthoquinones Plumbagin and Shikonin. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**, v. 36, p. 2589-2594, 1992.
- FUMAGALI, E. GONÇALVEZ, R. A. C; MACHADO, M. F. P. S. VIDOTI, G. J. OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos g neros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 627-641, 2008.
- GAASCHT, F; DICATO, M; DIEDERICH. Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) contains powerful compounds that prevent and cure cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 1-18, 2013.

FREITAS, A. S; FONTES CUNHA, I. M; ANDRADE-VIEIRA, L.F; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 124, p. 426–434, 2016.

GHOSH, A; CHOWDHURY, N; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian J Med Res**, v. 135, p. 581-598, 2012.

GONÇALVES, S; FERRAZ, M; ROMANO, A. Phytotoxic properties of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extracts and its main compound plumbagin, **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 96-101, 2009a.

GONÇALVES, S; QUINTAS, C; GASPAR, J. M. F; NOGUEIRA, A; ROMANO, A. Antimicrobial activity of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extract, an endemic Mediterranean insectivorous plant. **Natural products research**, v. 23, p. 219-229, 2009b.

GONÇALVES, S; XAVIER, C; COSTA, P; ALBERÍCIO, F; ROMANO, A. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activity of *Drosophyllum lusitanicum* extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1601-1698, 2010.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*, A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 99, 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens, **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

HARASHIMA, H; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 13, p. 66-74, 2010.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <[www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)> Acesso em: 17 set. 2018.

HOOK, I. L. Naphthoquinone contents of in vitro cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and Drosera species, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 281-285, 2001.

INBARAJ, J. J; CHIGNELL, C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes, **Chem Res Toxicol.**, v. 17, p. 55-62, 2004.

INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Acerca dos Agrotóxicos. 2015. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)> Acessado em: 21/08/2018.

JUNIPER, B. E; ROBINS, R. J; JOEL, D. M. The carnivorous plants. **Academic Press Inc. / Harcourt Brace Jovanovich, Publishers**, 1989.

KANASHIRO, M. M. O. O. Avaliação da toxicidade do glifosato e da deltametrina em solo. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

KAWIAK, A; PIOSIK, J; STASILOJC, G; GWIZDEK-WISNIEWSKA, A; MARCZAK, L; STOBIECKI, M; LOJKOWSKA, E. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 223, p. 267-276, 2007

KAWIAK A, ZAWACKA-PANKAU J, LOJKOWSKA E. Plumbagin induces apoptosis in Her2-overexpressing breast cancer cells through the mitochondrial-mediated pathway. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 747-751, 2012.

KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. **Nature reviews genetics**, v. 2, p. 815-822, 2001.

KLAUS, V; HARTMANN, T; GAMBINI, J; GRAF, P; STAHL, W; HARTWIG, A; KLOTZ, L-O. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, p. 93-100, 2010.

KONG, M. S; MA, T-H, Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, p. 221-228, 1999.

KREHER, B; NESZMÉLYI, A; WAGNER, H. Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 605-606, 1990.

KROLICKA, A; SZPITTER, A; GLIGENAST, E; ROMANIK, G; KAMINSKI, M; LOJKOWSKA, E. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 216-221, 2008.

KUBO, I; TANIGUCHI, M; CHAPYA, A; TSUJIMOTO, K. An insect antifeedant and anti-microbial agent from *Plumbago capensis*. **Planta Med (suppl.)**, p. 185–187, 1980.

KUO, P-L; HSU, Y-L; CHO, C-Y. Plumbagin induces G<sub>2</sub>-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/ mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 3209-3221, 2006.

KUMAR, M. R; AITHAL, K; RAO, B. N; UDUPA, N; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 242-250, 2009.

KUMAR, G; DWIVEDI, S. Induced nuclear pleomorphism in pollen mother cells of *Crotaria juncea* L. (Sunnhemp). **Cytologia**, v. 81, p. 323-327, 2016.

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

LEMOS, V. F; CARVALHO, A. C. B; ORTIZ, R. S. Perfil nacional de apreensões de agrotóxicos pela Polícia Federal, **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 7-1, p. 21-25, 2018.

LIN, L. C; YANG, L. L; CHOU, C. J. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. **Phytochem**, v. 62, p. 619–622, 2003.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, pp.191, 2011.

MA, T-H; XU, Z; XU, C; MCCONNELL, H; RABAGO, E. V; ARREOLA, G. A; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.332, p. 185-195, 1995.

MACHADO, B. R. Avaliação da toxicidade ambiental do agrotóxico Glifosato em solo utilizando como bioindicador minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental e Sanitária), 2016.

MARCHI, G; MARCHI, E. C. S; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso, Embrapa Cerrados (Planaltina, DF), 36 p., 2008.

MARCHIONATTI, A. M; PICOTTO, G; NARVAEZ, C. J; WELSH, J; TOLOSA DE TALAMONI, N. G. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)2D3 on breast cancer cells. **J. Steroid Biochem Mol Biol**, v. 113, p. 227-232, 2009.

MARTINS, M. N. C; SOUZA, V. V; SOUZA, T. S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 148, p. 481-486, 2016.

MASOTTI, V; JUTEAU, F; BESSIÈRE, J. M; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities, **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

MATSUMOTO, S. T; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potencial of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia** v. 69, p. 399-408, 2004.

MEYER, M. J. J; VAN DER KOOY, F; JOUBERT, A. Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 654–656, 2007.

MIYOSHI, E; SHIZURI, Y; YAMAMURA, S. Isolation and structures of diomuscipulone and diomuscipulone from *Dionaea muscipula*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2385-2387, 1984.

MOREIRA, J. C; JACOB, S. C; PERES, F; LIMA, J. S; MEYER, A; OLIVEIRA-SILVA, J. J; SARCINELLI, P. N; BATISTA, D. F; EGLER, M; FARIA, M. V. C; ARAÚJO, A. J; KUBOTA, A. H; SOARES, M. O; ALVES, S. R; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana

em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7-2, p. 299-311, 2002.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v. 15, p. 473-497, 1962.

NAHÁLKA, J; BLANARIK, P; GEMEINER, P; MATÚSOVA, E; PARTLOVÁ, I. Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. **J. Biotechnol.**, v. 49, p. 153-161, 1996.

NOLDIN, V. F; CECHINEL FILHO, V; MONACHE, F. D; BENASSI, J. C; CHRISTMANN, I. L, PEDROSA, R. C; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química nova**, v. 26, p. 331-334, 2003.

OOSTENDORP, M; KUNZ, W; DIETRICH, B; STAUP, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 19-28, 2001.

PADHYE, S; DANDAWATE, P; MUJAHIB, Y; AHMAD, A; SARKAR, F.H. Perspectives on Medicinal Properties of Plumbagin and Its Analogs. **Medicinal Research Reviewa**, v. 32, p. 1131-1158, 2012.

PAIVA, S. R; FIGUEIREDO, M. R; ARAGÃO, T. V; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 959-961, 2003.

PAIVA, S. R; LIMA, L. A; FIGUEIREDO, M. R; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, p. 499-504, 2004.

PAKULSKI, G. BUDZIANOWSK, J. Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures. **Phytochemistry**, v. 41:3, p. 775-778, 1996.

PANICHAYUPAKARANANT, P; AHMAD, M. I. Plumbagin and Role in Chronic Diseases. **Adv. Exp med biol**, v. 929. p. 229-246, 2016.

PICHERSKY, E; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective, **Trends in Plants Science**, v. 5-10, p. 439-445, 2000.

PAVLOVIC, A; JAKSOVÁ, J; NOVÁK, O. Triggering a false alarm: wounding mimics prey capture in the carnivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*), **New Phytologist**, v. 216, p. 927-938, 2017.

PÉREZ, J. C; HUAMAN, A. R; GUTIÉRREZ, L. L; SOTO, P. H; RUNSER, J. L. Determinación y cuantificación de plumbagina por HPLC-UV extraída de *Dionaea muscipula* e. cultivada in vitro. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 83:4, p. 382-390, 2017.

PERES, M. T. L. P; MALHEIROS, A. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (eds.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó-SC. Editora Universitária Argus, p.504-521, 2001.

PERIOTTO, F; PEREZ, S. C. J. G. A; LIMA, M. I. S. Allelopathic effect of *Andira humilis* Mart. Ex Benth in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18-3, p. 425-430, 2004.

PINHEIRO, P. F; COSTA, A. V; ALVES, T. D. A; GALTER, I. N; PINHEIRO, C. A; PEREIRA, A. F; FONTES, M. M. P. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, 8981-8990, 2015.

POWOLNY, A. A; SINGH, S. V. Plumbagin-induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells is Associated with Modulation of Cellular Redox Status and Generation of Reactive Oxygen Species, **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2171-2180, 2008.

PRADEEPA, V; SATHISH-NARAYANAN, S; KIRUBAKARAN, S. A; SENTHIL-NATHAN, S. Antimalarial efficacy of dynamic compound of plumbagin chemical constituent from *Plumbago zeylanica* Linn (Plumbaginaceae) against the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 113, p.3105–3109, 2014.

PUIG, C. G; REIGOSA, M. J; VALENTÃO, P; ANDRADE, P. B; PEDROL, N. Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract, **PLoS ONE**, v. 13, p. 1-16, 2018.

RANK, J; LOPEZ, L. C; NIELSEN, M. H; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v.136, p. 13-18. 2002.

RANK, J; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, p. 17-24, 1994.

RAO, B. V. Cytological effects of pendimethalin in *Allium cepa* root meristems. **Cell Chromo. Res.** v. 12, p. 57–59, 1989.

REESE, S; VIDYASAGAR, A; JACOBSON, L; ACUN, Z; ESNAULT, S; HULLETT, D; MALTER, J. S; DJAMALI, A. The Pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via Pin 1-independent mechanisms in the unilateral ureteral occlusion model. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 3, 2010.

ROMAN, E.E. Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação. São Paulo: Berthier, 2007.

ROSS, M. A; CHILDS, D. J. Herbicide mode of action summary. Cooperative extension servisse, Purdue University, West Lafayette, 1996. Disponível em: <<https://www.extension.purdue.edu/extmedia/ws/ws-23-w.html>> Acessado: 26/09/2018.

RICE, E. L. Allelopathy. Academic Press, Orlando, FL. 1984.

SANTOS, F. E; CARVALHO, M. S. S; SILVEIRA, G. L; CORREA1, F. F; CARDOSO, M. G; ANDRADE-VIEIRA, L. F; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, p. 1-11, 2018.

SEPÚLVEDA-BOZZA, S; CASSELS, B. K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med**, v. 62, p. 98–105, 1996.

SESHADRI, P; RAJARAM, A; RAJAHAM, A. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 2090-2107, 2011.

SILVA, C. B; SIMIONATTO, E; HESS, S. C; PERES, M. T. L. P; SIMIONATTO, E. L; JÚNIOR, A. W; POPPI, N. R; FACCENDA, O; CÂNDIDO, A. C. S; SCALON, S. P. Q. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* LAM (ARALIACEAE), **Química Nova**, v. 32, p. 2373-2376, 2009.

SILVA, L. O. C; SILVA, A. A; QUEIROZ, M. E. L. R; LIMA, C. F; ROCHA, P. R. R; D'ANTONINO, L. Ação de *Eleusine coracana* na Remediação de Solos Contaminados com Picloram. **Planta Daninha**, v.30-3, p.627-632, 2012.

SILVA, C. P; RICCI, T. G; ARRUDA, A. L; PAGLIOSA, F. M; MACEDO, M. L. R. Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **Uniciências**, v. 21, p. 25-34, 2017.

SILVEIRA, G. L; LIMA, M. G. F; DOS REIS, G. B; PALMIERI, M. J; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v.178, p. 359-367, 2017.

SINAN. Sistema Nacional de Agravos de Notificação, Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/>>, Acessado em: 25/09/18.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Disponível em < <http://sindiveg.org.br/>> Acessado em: 08/08/2018.

SINGH, H. P; BATISH, D. R; KOHLI, R. K. Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 239-311, 2010.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em < <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>> Acessado em: 08/08/2018.

SOUZA, A. R. C; BALDONI, D. B; LIMA, J; PORTO, V; MARCUZ, C; FERRAZ, R. C; KUHN, R. C; JACQUES, R. J. S; GUEDES, J. V. C; MAZUTTI, M. A. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production, **Brazilian journal of Microbiology**, v. 48, p. 101-108, 2017.

SOUZA, A.P; VENDRAMIM, J.D. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de Nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. **Neotrop. Entomol.**, v. 31, p. 83-87, 2001.

TANVEER, A; SAFDAR, M. E; SULEMAN, M; TAHIR, M; ZAMIR, S. I; NADEEM, M. A. Avaliando o potencial dos alelopatas solúveis em água de *Marsilea minuta* em arroz e trigo. **Planta Daninha** v. 33 p. 231-239, 2015.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 5ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TEDESCO, S. B; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J.K. **Environmental Contamination**. p. 137-156, 2012.

THOMSON, R. H. Naturally occurring quinones. **2nd Edn. Academic Press**, 1971.

TIGRE, R. C; SILVA, N. H; SANTOS, M; HONDA, N; FALCÃO, E. P. S; PEREIRA, E. C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125-132, 2012.

TILAK, J. C; ADHIKARI, S; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. **Communications in Free Radical Research**, v.9, p. 1743-2928, 2013.

TODERO, I; CONFORTIN, T. C; LUFT, L; BRUN, T; UGALDE, G. A; ALMEIDA, T. C; ARNEMANN, J. A; ZABOT, G. L; MAZUTTI, M. A. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, p. 285-292, 2018.

TOKARZ, K; MAKOWSKI, W; BANASIUK, R; KROLICKA, A; PIWOWARCZYK, B. Response of *Dionaea muscipula* J. Ellis to light stress in in vitro: physiological study, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, p. 65-77, 2018.

TOKUNAGA, T; TAKADA, N; UEDA, M. Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defence in carnivorous plant. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 7115-7119, 2004.

VERPOORTE, R; VAN DER HEIJDEN, R; TEN HOOPEN, H. J. G; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals, **Biotechnol Lett**, v. 21 p. 467-479, 1999.

VAN DER VIJVER, L. M. Distribution of plumbagin in the Plumbaginaceae. **Phytochem**, v. 11, p.3247-3248. 1972.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z; PAVLICA, M; REGULA, I; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 43, p. 284–291, 2002.

VIDAL, R. A. Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre, 165 p., 1997.

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

WIDHALM, J. R; RHODES, D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants, **Horticulture Research**, v. 3, online. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2016.46>>, Acessado: 10/08/18

WANG, Z. Y; ZONG, J.J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, p. 93-97, 2002.

ZABLOTOWICZ, R. M; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.

ZENK, M. H; FÜRBRINGER, M; STEGLICH, W. Occurrence and distribution of 7-methyljuglone and plumbagin in the droseraceae. **Phytochemistry**, v. 8, p. 2199-2200, 1969.