

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

QUEZIA PAINS DUTRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Sparattanthelium* Mart. (Hernandiaceae) E AVALIAÇÃO DE
FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM PLANTAS MODELO**

**ALEGRE-ES
2019**

QUEZIA PAINS DUTRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Sparattanthelium* Mart. (Hernandiaceae) E AVALIAÇÃO DE
FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM PLANTAS MODELO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Dra. Milene Miranda Praça Fontes

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

D978c Dutra, Quezia Pains, 1994-
Caracterização Dos Constituintes Voláteis
De Espécies Do Gênero *Sparattanthelium* Mart.
(Hernandiaceae) E Avaliação de Fitotoxicidade e
Citotoxicidade em Plantas Modelo / Quezia Pains
Dutra. - 2019.
49 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. Potencial biológico. 2. *Sparattanthelium*. 3. bioherbicida.
4. bioensaio vegetal. I. Fontes, Milene Miranda Praça. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 631.523

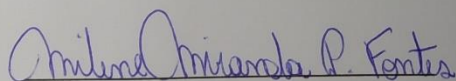
QUEZIA PAINS DUTRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Sparattanthelium* Mart. (Hernandiaceae) E AVALIAÇÃO DE
FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM PLANTAS MODELO**

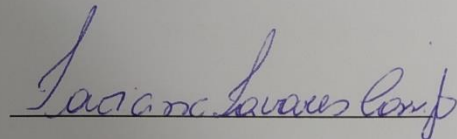
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

27 de fevereiro de 2019.

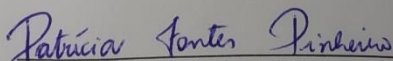
Comissão Examinadora:



Dra. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo



Dra. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo



Dra. Patrícia Fontes Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico

Aos meus pais, meus irmãos, minhas avós e minhas tias.

Ofereço

À minha orientadora Milene Miranda Praça Fontes.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre estar comigo em todos os momentos;

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio no desenvolvimento desse projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento;

À CAPES pela concessão da bolsa e pelo financiamento da pesquisa a qual esse trabalho está vinculado;

A minha orientadora Milene Miranda Praça Fontes pela dedicação e esforço para a construção deste trabalho, você é especial em minha vida;

Aos amigos dos Laboratórios de Citogenética, Genética e Melhoramento Vegetal, e Botânica por participarem no desenvolvimento desta pesquisa de maneira mais alegre e descontraída;

Ao meus amigos João Paulo, Cristiana, Jhennifer, Filipe, Sara, Thammyres, Ariane, Darley Tavares, Samira, e Alda pela colaboração com a montagem do experimento, execução e força nos momentos difíceis;

À minha família pelo apoio incondicional, em especial aos meus pais, irmãos, avós, tias e namorado, por acompanharem e apoiarem todas as minhas decisões;

Ao meu namorado por todo amor e compreensão em todas as etapas desse trabalho. Eu amo você

Às meninas da minha república, Denise, Carol, Laisa e Isabela por sempre me apoiarem e estarem comigo até o final dessa etapa. Foram essenciais para que essa dissertação pudesse ser concluída. Eu amo vocês;

Aos meus amigos de academia, Cibele, Matheus e Helaine que sempre me motivaram a nunca nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

A todos muito obrigada!!!!

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar”*

Paulo Freire

Lista de figuras

Figura 1. Fitotoxicidade dos óleos essenciais de *Sparattanthelium botocudorum* e *Sparattanthelium tupiquinorum*; água, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em sementes e plântulas: (A) *Sorghum bicolor* e (B) *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L^{-1} , avaliadas das moléculas..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Alterações cromossômicas e nucleares, em (a) micronúcleo em metáfase (b) atraso em anáfase, em (c) ponte em anáfase, (d) micronúcleo em interfase, (e) cromossomo perdido e (f) c-metáfase, observadas nas células meristemáticas de alface tratadas com os óleos essenciais de *S. botocudorum* e *S. tupiquinorum* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 mmol.L^{-1} . As setas pretas indicam a alteração observadas. Barra de escala: 10 μm **Erro! Indicador não definido.**

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação dos compostos majoritários (>5%) do óleo essencial *Sparattanthelium botocudorum*.... 20

Tabela 2. Identificação dos compostos majoritários (>5%) do óleo essencial *Sparattanthelium tupiquinorum*.

.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. Análise de células das raízes de *Lactuca sativa* tratadas com diferentes concentrações (mmol L⁻¹) dos óleos essenciais de *Sparattanthelium botocudorum* (óleo 1) e *Sparattanthelium tupiquinorum* (óleo 2).**Erro!**

Indicador não definido.

Sumário

Artigo: Caracterização dos Constituintes Voláteis de Espécies do Gênero <i>Sparattanthelium</i> Mart. (Hernandiaceae) e Avaliação de Fitotoxicidade e Citotoxicidade em Plantas Modelo.....	8
Resumo	12
Abstract.....	10
Introdução.....	13
Material e Métodos.....	16
<i>Material vegetal</i>	<i>16</i>
<i>Extração dos óleos essenciais.....</i>	<i>16</i>
<i>Análises fitoquímicas dos óleos essenciais</i>	<i>17</i>
<i>Ensaio fitotóxico</i>	<i>18</i>
<i>Ensaio citotóxico.....</i>	<i>19</i>
<i>Análises estatísticas</i>	<i>20</i>
<i>Composição química dos óleos essenciais</i>	<i>20</i>
<i>Fitotoxicidade</i>	<i>21</i>
<i>Citotoxicidade</i>	<i>26</i>
Discussão	32
<i>Composição química dos óleos essenciais</i>	<i>32</i>
<i>Fitotoxicidade</i>	<i>33</i>
<i>Citotoxicidade</i>	<i>35</i>
Conclusão	38
Referências	38

Artigo: CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUENTES VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Sparattanthelium* Mart. (Hernandiaceae) E AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM PLANTAS MODELO

Quezia Pains Dutra¹, Jhennifer Alberts Crist², Tatiana Carrijo Tavares^{1,3}, Thayllon de Assis Alves³, Thammyres de Assis Alves³, Luiza Alves Mendes⁴, Milene Miranda Praça Fontes^{1,3*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, s/n. ZIP: 29.500-000 Alegre – ES, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Botânica, Departamento de botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, ZIP: 20940-040, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

³Departamento de Biologia, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, s/n. ZIP: 29.500-000 Alegre – ES, Brazil.

⁴Departamento de Física e Química, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, s/n. ZIP: 29.500-000 Alegre – ES, Brazil.

Resumo

O Brasil tem se destacado na produção de agroquímicos, no entanto sua utilização na agricultura tem desencadeado problemas relacionados ao ambiente e a outros organismos. As plantas são reservatórios de metabólitos secundários e podem apresentar efeito alelopático, potencialmente interessante para serem utilizados como bioherbicidas. Esses metabólitos podem ser encontrados em óleos essenciais, em Angiospermas basais. Consideradas relevantes economicamente, plantas desse grupo são utilizadas com fins medicinais e apresentam atividade antiproliferativa em células cancerígenas e antimicrobiana. Entretanto, algumas espécies possuem potencial alelopático e bioherbicida desconhecidos, como as do gênero *Sparattanthelium*, exclusivamente neotropical. Poucas espécies do gênero foram caracterizadas quimicamente e não se conhece o potencial biológico dos compostos encontrados. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Sparattanthelium botocudorum* e *Sparattanthelium tupiquinorum* em bioensaios com as espécies *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*. Os óleos foram testados nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 ppm. Realizou-se a caracterização química e avaliou-se o percentual de sementes germinadas, o desenvolvimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa* L. e *Sorghum bicolor* L. e as alterações no ciclo mitótico de células meristemáticas de raízes de *L. sativa*. O composto majoritário de ambas espécies foi germacreno D (33,2 e 44,8%), seguido de biciclogermacreno (23,4 e 16,9%), β -elemeno (8,4 e 5,1%), germacreno A (17,7 e 8,7%). Tras-nerolidol (7,7%) foi encontrado apenas em *S. botocudorum* e γ -Cadineno (15%) em *S. tupiquinorum*. O ensaio fitotóxico revelou que o óleo essencial das duas espécies reduziu o crescimento radicular e aéreo de sementes de *L. sativa*. Em *S. bicolor* reduziu a germinação e o crescimento aéreo. No ensaio citotóxico observou-se diminuição do índice mitótico e aumento de alterações cromossômicas e nucleares, resultantes da ação aneugênica e clastogênica dos óleos essenciais de *S. botocudorum* e *S. tupiquinorum*.

Palavras-chave: *Potencial biológico, Sparattanthelium, bioherbicida, bioensaio vegetal*

Abstract

Brazil has been prominent in the production of agrochemicals; however, its use in agriculture has related to the environment and other organisms. The plants are reservoirs of secondary metabolites and may present allelopathic effect, being interesting to be used as bioherbicides. These metabolites can be found in essential oils in basal angiosperms. They have been found to be economically useful, such as groups are used for medicinal purposes and have shown antiproliferative activity in cancerous and antimicrobial cells. However, some species have unknown allelopathic and bioherbicidal potential, such as the genus *Sparattanthelium*, exclusively neotropical. Few species of this genus have been chemically characterized and the biological potential of the compounds is not known. The objective of this work was to evaluate the effect of the essential oils extracted from the leaves of *Sparattanthelium botocudorum* and *Sparattanthelium tupiquinorum* in bioassays with the species *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. The oils were tested at concentrations of 3000, 1500, 750, 375 and 187.5 ppm. The chemical characterization was performed and the percentage of germinated seeds, the initial development of *Lactuca sativa* L. and *Sorghum bicolor* L. seedlings and the changes in the meristematic cycle of *L. sativa* roots. The major compound of both species was germacrene D (33.2 and 44.8%), followed by bicyclogermacrene (23.4 and 16.9%), β -element (8.4 and 5.1%), germacrene A (17.7 and 8.7%). *Tras-nerolidol* (7.7%) was found only in *S. botocudorum* and γ -Cadinene (15%) in *S. tupiquinorum*. The phytotoxic assay revealed that the essential oil of both species reduced the root and aerial growth of *L. sativa* seeds. In *S. bicolor* it reduced germination and aerial growth. In the cytotoxic assay, the mitotic index and the increase of chromosomal and nuclear alterations resulting from the aneugenic and clastogenic action of the essential oils of *S. botocudorum* and *S. tupiquinorum* were observed.

Key words: Biological potential, *Sparattanthelium*, bioherbicide, plant bioassay

Introdução

O Brasil é considerado o maior consumidor de agroquímicos no mundo (Inca, 2015). Os herbicidas têm se destacado entre os agroquímicos mais aplicados no campo, tendo como foco o controle de plantas daninhas. A utilização destes compostos tem desencadeado problemas relacionados à resistência das plantas, contaminação ambiental e riscos à saúde do homem e de animais. Portanto, existe a necessidade de encontrar métodos alternativos para o controle de pragas agrícolas (Souza et al., 2006). Diante disso, os metabólitos secundários podem ser usados diretamente ou indiretamente na obtenção de novos herbicidas. Esses compostos são produzidos pelos vegetais e sua biossíntese origina três grandes grupos: terpenoides, alcalóides e compostos fenólicos. Estes compõem os óleos essenciais, que possuem importante papel na defesa da planta ao ataque de herbívoros, pragas e na competição com outras espécies, sendo produzidos, variavelmente, de acordo com as interações com o meio ambiente (Simões et al., 2010).

Os óleos essenciais são produtos voláteis, encontrados em todos os órgãos do vegetal, sendo obtidos por diferentes processos, dependendo da localização na planta, da quantidade e das características requeridas para o produto final (Brasil, 2010). O conhecimento sobre a estrutura dos metabólitos secundários presentes nos óleos pode auxiliar na classificação botânica, permitindo reconstruir com maior fidelidade a história evolutiva de um grupo (Kim et al., 2010). Além disso, identificar possíveis efeitos alelopáticos dos óleos essenciais possibilita o desenvolvimento de produtos naturais e a descoberta do potencial de substâncias biologicamente ativas (Demyttenaere e Kimpe, 2001; Beltrame et al., 2010; Freire et al., 2011). Essas substâncias, conhecidas como aleloquímicos, podem ser uma fonte favorável para o desenvolvimento de herbicidas naturais. O uso desses compostos pode contribuir na redução dos impactos ambientais causados pelos herbicidas comerciais ou atuarem como estimulantes do crescimento de plantas (Al-Shatti et al., 2014; Ferreira e Aquila, 2000; Wardle et al., 2011;

Felito et al., 2016).

Famílias de angiospermas basais, Hernandiaceae, Lauraceae e Piperaceae, são bastante estudadas em virtude da presença de óleos essenciais. As espécies destas famílias possuem relevância por serem produtoras de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas (Souza et al., 2005; Yamaguchi et al., 2011; Pena et al., 2000). O gênero *Hernandia*, por exemplo, possui representantes importantes pelas suas propriedades medicinais, anti-inflamatórias e depurativas do sangue (Conserva et al., 2005). Isso se deve pela presença de alcalóides em espécies desse gênero (Rumjanek et al., 1991; Aniszewski, 2007).

Em espécies do gênero *Sparattanthelium*, da família Hernandiaceae, o potencial biológico permanece pouco conhecido. Apenas duas espécies do gênero foram caracterizadas, *Sparattanthelium amazonum* Mart e *Sparattanthelium uncigerum* (Meissn) Kubitzki. Estes estudos mostraram que alguns alcalóides possuem atividade contra cepas resistentes e sensíveis de *Plasmodium falciparum*, um protozoário que causa malária em humanos (Munoz, 1999). Além disso, as espécies descritas na literatura, possuem atividades medicinais, utilizadas por comunidades indígenas no controle de problemas digestivos, dor de estômago, vômito e diarreia (Munoz, 1999, Chalandre et al., 1985). Tal fato demonstra a necessidade de estudos sobre a atividade biológica de espécies pertencentes a esse gênero.

A avaliação da atividade biológica e identificação de compostos bioativos têm sido empregado em pesquisas com auxílio dos bioensaios vegetais (Aragão et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Aragão et al., 2017; Alves et al., 2018; Santos et al., 2018). As análises de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e determinação de mecanismos de ação do composto de interesse estão entre os testes utilizados. Estes, por sua vez, apresentam resultados eficientes em um curto período de tempo. Organismos modelos, como monocotiledôneas e eudicotiledôneas, apresentam baixo custo e similariedade nos resultados com testes realizados em mamíferos (Aragão et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Aragão et al.,

2017; Silveira et al., 2017).

O conhecimento sobre a atividade biológica em espécies da família Hernandiaceae se restringe apenas a representantes do gênero *Hernandia*. Diante disso, investigar o potencial das espécies de outros gêneros pode contribuir para ampliar o conhecimento do grupo e direcionar seu uso com base na composição química, o que potencializará seus efeitos. Assim, este trabalho teve como objetivos: 1) determinar a composição química dos óleos essenciais extraídos de folhas de *Sparattanthelium botocudorum* e *Sparattanthelium tupiquinorum* e 2) realizar bioensaios com os óleos essenciais dessas espécies a fim de avaliar as propriedades fitotóxicas dos óleos nos modelos vegetais *Lactuca sativa* L, uma eudicotiledônea, e *Sorghum bicolor* L Moench, uma monocotiledônea, e as propriedades citotóxicas e genotóxicas em *L. Sativa*.

Material e Métodos

Material vegetal

Para a extração dos óleos essenciais, folhas de *S. botocudorum* e *S. tupiniquinorum*, foram coletadas no mesmo dia e horário (21° 07'02.5" S 41°18'42.7"W, dados da coleta: JA Christ). Essas espécies são exclusivamente Neotropical (Kubitzki 1969). Das 13 espécies atualmente reconhecidas para o gênero, dez ocorrem no Brasil, sendo este um centro de diversidade do gênero. A espécie *S. Botocudorum* é endêmica do Brasil.

Para os testes de fitotoxicidade e citotoxicidade utilizou-se sementes comerciais de *Lactuca sativa* (variedade Crespa) (eudicotiledônea) e sementes de *Sorghum bicolor* (monocotiledônea) (Cultivar: IAC Santa Elisa).

Extração dos óleos essenciais

As análises foram realizadas no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos

Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre- ES. O método de extração utilizado foi a hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante quatro horas de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (Souza et al., 2010). Foram utilizadas cerca de 200 g de folhas frescas em aproximadamente 1 L de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2 L. Em seguida o balão foi acoplado ao aparelho onde realizou a extração por três horas após a água entrar em ebulição. O hidrato obtido das folhas foi centrifugado a 5000 rpm, durante 3 min, de forma a promover a separação entre as fases aquosa e oleosa. Como o auxílio de uma pipeta de Pauster, o óleo (sobrenadante) foi retirado e armazenado em frasco âmbar em freezer a -20 C, protegido da luz (Pinheiro et al., 2015, Mendes et al., 2018).

Análises fitoquímicas dos óleos essenciais

As amostras dos óleos essenciais extraídos das folhas foram analisadas por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE) de acordo com o protocolo de Souza et al. (2017) com adequações. Para essas análises, as seguintes condições foram empregadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de 2,80 mL.min⁻¹ e 50,8 cm.sec⁻¹ (GC-FID) e 1,98 mL.min⁻¹ e 50,9 cm.sec⁻¹ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx®-5MS (0,25 µm de espessura do filme); a temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C.min⁻¹ até atingir 180 °C, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas utilizadas nos detectores FID e MS foram de 240 e 200 °C, respectivamente.

As amostras utilizadas foram retiradas dos vials em um volume de 1 μL de uma solução de 2% de óleo essencial dissolvido em etanol. As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos.seg⁻¹ e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H₂ e ar atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL.min⁻¹ e 400 mL.min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente. A detecção dos íons ocorre quando os compostos orgânicos presentes na amostra são misturados com o gás de arraste (He) e é produzida uma corrente proporcional à quantidade desses compostos na amostra. Se somente o He e o H₂ forem misturados, uma pequena corrente é produzida entre os eletrodos.

A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção de Kovats (IK). Para o cálculo dos IK, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C7-C40 (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em GC-FID. Os compostos com área relativa acima de 1% foram identificados e acima de 5% foram considerados majoritários (Mendes et al., 2018).

Bioensaios vegetais

Ensaio fitotóxico

As análises fitotóxicas foram realizadas no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre- ES. Para cada

óleo essencial, *Sparattanthelium botocudorum* e *S. tupiniquinorum*, foram avaliadas cinco concentrações: 3000ppm; 1500ppm; 750ppm; 375ppm e 187,5ppm. A água destilada e o solvente Diclorometano foram usados como controle negativo e o glifosato como controle positivo. Vinte e cinco sementes de *L. sativa* e de *S. Bicolor* foram colocadas em placas de Petri, totalizando 5 repetições para cada tratamento. As sementes foram colocadas em papel filtro umedecido com 2,5 mL de óleo diluído no solvente. As placas de Petri foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e colocadas em BOD à 24°C durante todo o experimento. A porcentagem de sementes germinadas foi observada após 8, 16, 24, 36 e 48 h de exposição aos tratamentos, enquanto o crescimento das raízes e parte aérea foi determinada com paquímetro digital após 48 e 96 horas, respectivamente, de exposição aos óleos. A partir dos dados obtidos, foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de germinação (protrusão da radícula) após 48 h (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR) e crescimento de parte aérea (CA), em mm, segundo Aragão et al. (2015).

Ensaio citotóxico

Após 48 h de exposição, as raízes emitidas foram retiradas e fixadas em Carnoy I (3:1 metanol + ácidos acético), em seguida armazenadas a -20° C por pelo menos 24 h. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento. As radículas foram hidrolisadas em HCl 5N a temperatura ambiente por 18 minutos e, posteriormente, a região meristemática foi retirada e colocada em uma lâmina e corada com orceína acética a 2%, recoberta por lamínula e esmagada. Cada lâmina foi preparada usando dois meristemas tratados, com cinco lâminas sendo avaliado por tratamento (uma lâmina de cada placa de Petri). Foram avaliadas mil células por lâmina, para um total de 5.000 células meristemáticas observadas por tratamento. As diferentes fases da divisão mitótica, bem como possíveis alterações cromossômicas e nucleares foram observadas e registradas. As variáveis índice mitótico (IM), frequência de alterações

cromossômicas (AC) observadas (cromossomos perdidos, cromossomos aderentes, fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas, c-metáfases e poliploidização cromossômica) e alterações nucleares (AN) foram obtidas, sendo calculadas de acordo com Aragão et al. (2015).

Análises estatísticas

Os resultados obtidos com as análises de fitotoxicidade e citotoxicidade foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Dunnett à 5% de significância. Esse teste foi escolhido para comparar tratamentos com controles (Bernardes et al., 2015) e também por ser sensível e capaz de identificar pequenas diferenças entre grupos (Mchugh, 2011). O programa utilizado foi o Genes (*Software for Experimental Statistics in Genetics*) (Cruz, 2013).

Resultados

Composição química dos óleos essenciais

O rendimento dos óleos essenciais de *Sparattanthelium botocudorum* e *Sparattanthelium tupiquinorum* foi de 0.34% e 0.43%, respectivamente, por fração fresca de folha. Por meio das análises cromatográficas foram identificados 5 compostos presentes nos óleos essenciais dessas espécies (Tabela 1). No óleo essencial de *S. botocudorum* o composto majoritário foi Germacreno D com 33,2%, seguido de Biciclogermacreno, 23,4%; Germacreno A, 17,7; β -Elemeno, 8,4% e trans-Nerolidol com 7,7%. O composto majoritário de *S. tupiquinorum* também foi Germacreno D com 44,8%; seguido de biciclogermacreno com 16,9%; γ -Cadineno, 15%; Germacreno A, 8,7; β -elemeno 5,1 %. Apenas um composto químico diferenciou as duas espécies, o trans-nerodiol em *S. botocudorum* e γ -Cadineno em *S. tupiquinorum*.

Tabela 1. Identificação dos compostos majoritários (>5%) dos óleos essenciais de

Sparattanthelium botocudorum (OE1) e *Sparattanthelium tupiquinorum* (OE2)

		OE1	OE2
n	Composto ^a	A _{rel} (%) ^b	A _{rel} (%) ^b
1	β-Elemeno	8,4	5,1
2	Germacreno D	33,2	44,8
3	Biciclogermacreno	23,4	16,9
4	Germacreno A	17,7	8,7
5	trans-Nerolidol	7,7	-
6	γ-Cadineno	-	15,0
	Total identificado	90,4	90,5

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bCompostos com área relativa > 5% foram identificados.

Fitotoxicidade

Nos ensaios macroscópicos foram avaliados a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e crescimento aéreo de *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*. Observou-se que o óleo essencial de *Sparattanthelium botocudorum* (OE1) em sementes de *Lactuca Sativa*, na variável porcentagem de germinação, não apresentou diferença significativa, suas médias ficaram próximas aos controles negativos (água e DCM). Houve uma redução no índice de velocidade de germinação na presença do OE1 em 3000ppm (Figura 1a), as médias foram menores que os controles positivo e negativos. Já no OE1 em 1500ppm as médias se aproximaram do controle positivo. As demais concentrações (750, 375 e 187,5ppm) foram semelhantes ao controle negativo água. Para o crescimento radicular, todas as concentrações apresentaram médias próximas ao controle negativo. O crescimento aéreo, no OE1 em 3000 e 1500ppm, foram inibidos quando comparados com o controle

negativo. O OE1 nas demais concentrações (750, 375 e 187,5ppm), não foram significativas quando comparadas com o controle negativo (Figura 1a).

Para os tratamentos realizados com *Sorghum bicolor*, a porcentagem de germinação, no OE1, apresentou médias próximas ao controle negativo (Figura 1b). A velocidade de germinação também não foi afetada pelo óleo essencial. O crescimento radicular, no OE1 em 3000ppm, apresentou médias próximas ao controle positivo e em 1500, 750, 375 e 187,5ppm não houve diferença significativa quando comparadas ao controle negativo (Figura 1b). O crescimento aéreo no OE1 em 3000ppm apresentou médias próximas ao controle positivo. As demais médias observadas com o OE1 foram próximas aos controles negativos.

Para o óleo essencial de *Sparattanthelium tupiquinorum* (OE2) testados em sementes de *Lactuca Sativa*, a porcentagem de germinação não foi afetada, pois as médias de todas as concentrações se aproximaram dos controles negativos. O índice de velocidade de germinação, no OE2 em 3000ppm, não foi significativo quando comparados com o controle positivo. As demais concentrações do OE2 se aproximaram do controle negativos. Houve redução do crescimento radicular quando expostas ao OE2 em 3000, 1500, 750 e 375ppm quando comparadas com os controles negativos e positivo (Figura 2a). Na variável crescimento aéreo, o OE2 em 3000 e 1500ppm, as médias se aproximaram do controle positivo. As demais apresentaram médias próximas ao negativo (Figura 2a).

No teste com sementes de *Sorghum bicolor*, a porcentagem de germinação, em todas as concentrações, tiveram suas médias próximas ao controle negativo, assim como o crescimento radicular no OE2 em 1500, 750, 375 e 187,5ppm. Entretanto, no OE2 em 3000ppm houve diferença significativa quando comparadas com os controles negativos e positivo (Figura 2b). No índice de velocidade de germinação, em OE2 as médias em 3000ppm, não foram significativas quando comparadas com controle positivo. Em

crescimento aéreo, houve uma redução das médias no OE2 em 3000ppm quando comparadas com os controles negativos e positivo (Figura 2b).

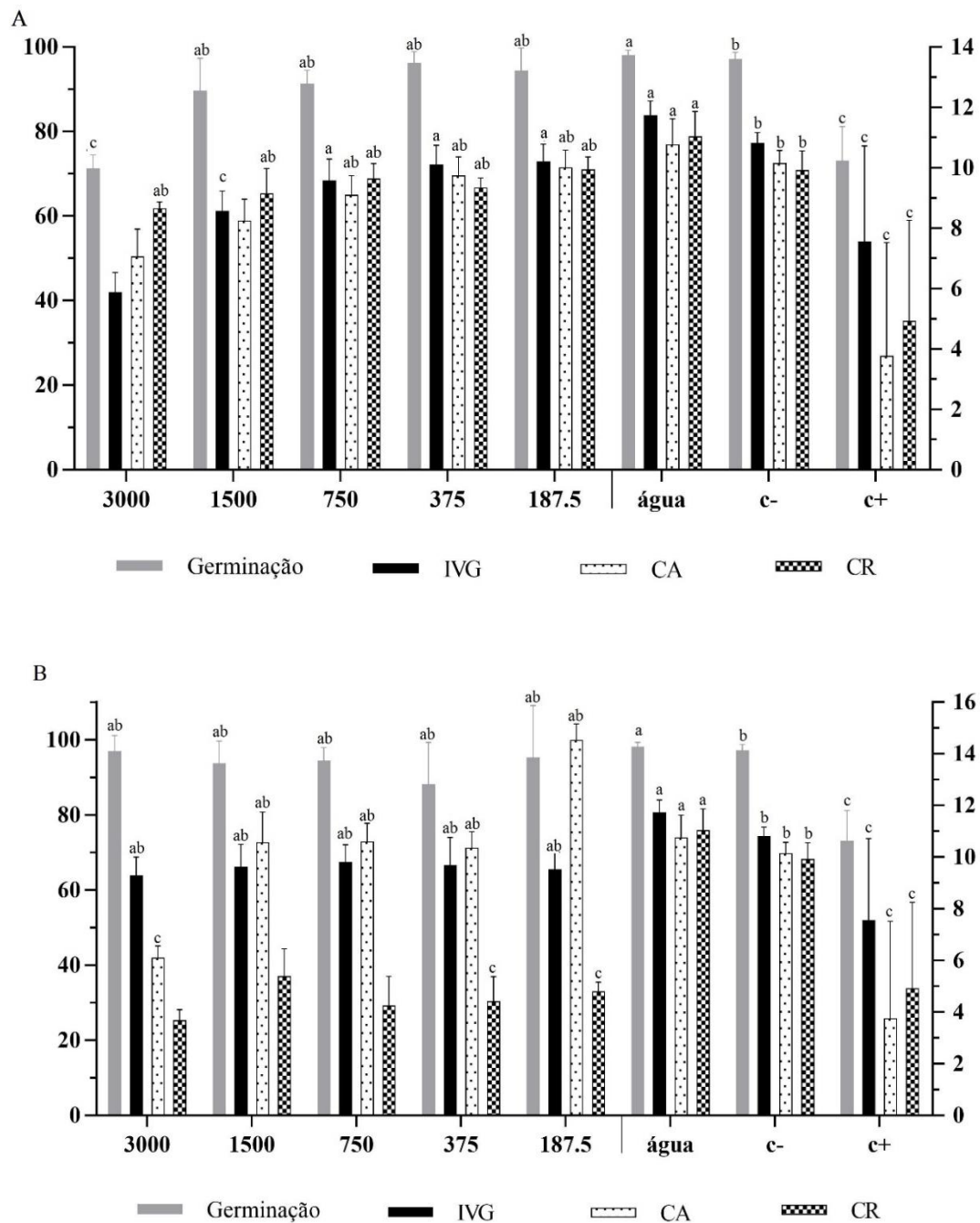


Figura 1. Fitotoxicidade de diferentes concentrações do óleo essencial de *Sparattanthelium botocudorum*; água, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em sementes e plântulas: (A) *Lactuca sativa* e (B) *Sorghum bicolor*. As médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra *b* se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra *c* se igualaram ao C+ glifosato. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em ppm, dos óleos essenciais. Onde: %G – representa a porcentagem de

sementes germinadas após 48h de exposição aos tratamentos; IVG – o índice de velocidade de germinação das sementes durante as primeiras 48h, avaliadas de 8 em 8h, após a exposição aos tratamentos; CR – tamanho das raízes em mm após 48h de exposição aos tratamentos; CA – tamanho da parte aérea da planta em mm após 120h de exposição aos tratamentos. O eixo y a esquerda refere –se as médias da germinação e a direita ao IVG, CR e CA.

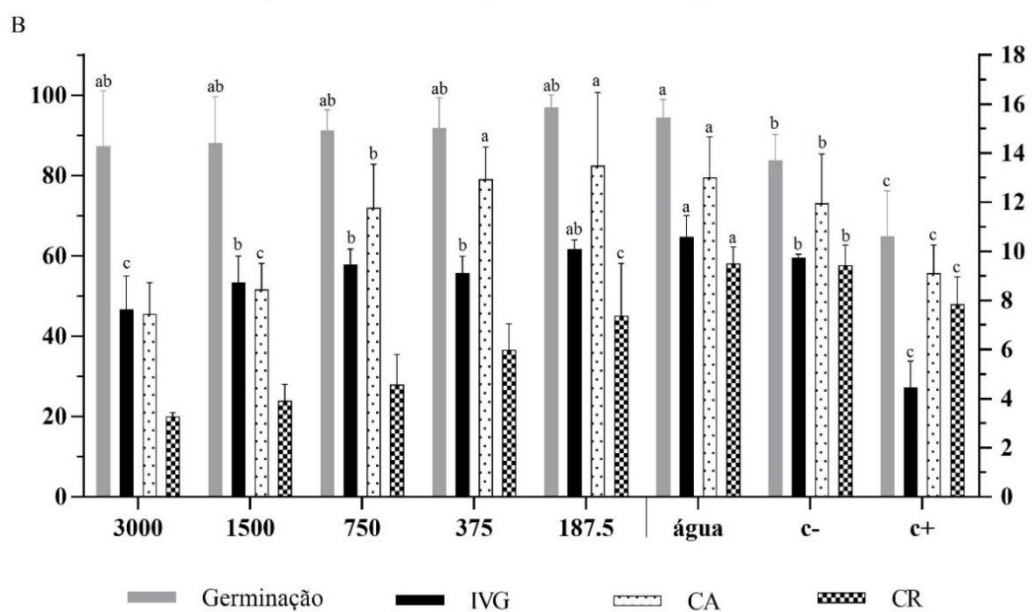
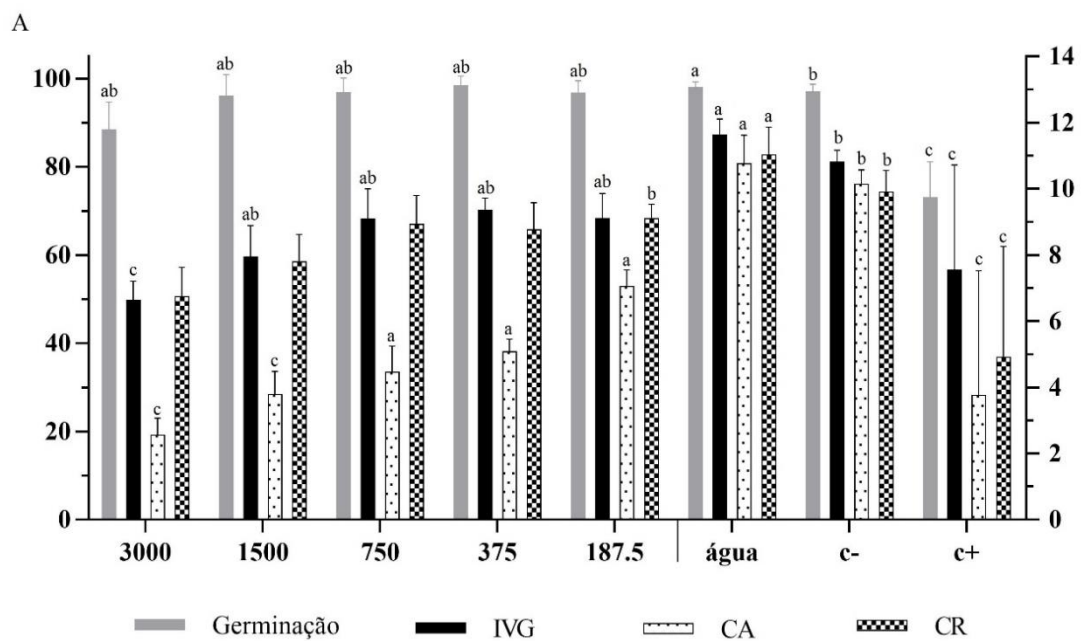


Figura 2. Fitotoxicidade de diferentes concentrações do óleo essencial de *Sparattanthelium tupiquinorum*; água, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em sementes e plântulas: (A) *Lactuca sativa* e (B) *Sorghum bicolor*. As médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- (água destilada), as seguidas pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em ppm, dos óleos essenciais. Onde: %G – representa a porcentagem de sementes germinadas após 48h de exposição aos tratamentos; IVG – o índice de velocidade de germinação das sementes durante as primeiras 48h, avaliadas de 8 em 8h, após a exposição aos tratamentos; CR – tamanho das raízes em mm após 48h de exposição aos tratamentos; CA – tamanho da parte aérea da planta em mm após 120h de exposição aos tratamentos. No eixo y a esquerda, refere-se as médias da germinação e o da direita IVG, CR e CA.

Citotoxicidade

Para as análises de citotoxicidade foram utilizados ensaios microscópicos para avaliar o índice mitótico, as alterações cromossômicas, as alterações nucleares, a frequência de micronúcleos e as frequências de cada tipo de AC observada (cromossomos perdidos, cromossomos aderentes, fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas, c-metáfases e poliploidização cromossômica).

Observou-se que houve uma diminuição no índice mitótico nas células expostas ao OE1, as médias diferiram dos controles negativos e positivo. Ocorreu um aumento das alterações cromossômicas, se diferenciando dos controles negativos e positivo, no OE1 em 3000, 1500, 750 e 375ppm (figura 3a). Apenas no OE1 em 187,5ppm não foram observadas diferenças significativas quando comparado ao controle positivo. As alterações nucleares e frequência de micronúcleo apresentaram diferenças significativas no OE1 em 3000ppm, quando comparadas

com os controles negativos e positivo. No OE1, nas demais concentrações, as médias se aproximaram do controle negativo. Para o OE2 o índice mitótico não apresentou diferença significativa em todas as concentrações, porém suas médias se aproximaram do controle positivo. Nas alterações nucleares e frequência de micronúcleos, no OE2 em 3000, 1500, 750ppm, observou-se diferença significativa quando comparadas com os controles negativos e positivos (Figura 3b).

A ocorrência das pontes cromossômicas foram diferentes dos controles negativos e positivos, com média 1,21 na concentração de 3000ppm e 0,98 em 1500 ppm, para o OE1 (Figura 4a e Anexo II). Para o OE2 em 3000, 1500, 750 e 375ppm, as médias se aproximaram do controle positivo (Figura 4b). Outras alterações foram observadas como atraso em anáfase (Figura 4a e 5b). Houve diferença estatísticas no OE2 nos tratamentos com o controle negativo. No OE2 em 187,5ppm não houve diferença significativa e as médias aproximaram do controle negativo. Para o OE2 em 3000, 1500, 750 e 375ppm, as médias se aproximaram do controle positivo (Figura 4b e Anexo II).

A aderência cromossômica é decorrente de alteração citológicas, genéticas e epigenéticas, indicando tanto ação aneugênica quanto ação clastogênica (Freitas et al., 2016; Santos et al., 2018). No presente estudo foi possível observar com frequência essa alteração no OE1 em 3000, 1500, 750 e 375ppm. No OE2, não houve diferença significativa quando testadas nas diferentes concentrações, as médias se aproximaram dos controles negativos.

As frequências de c-metáfase aumentaram quando as células foram expostas ao OE1 em 3000 e 1500ppm, quando comparadas com os controles negativos e positivos. Nas demais concentrações, as médias se aproximaram do controle negativo. No OE2, em 375 e 187,5ppm, as médias se aproximaram dos controles negativos.

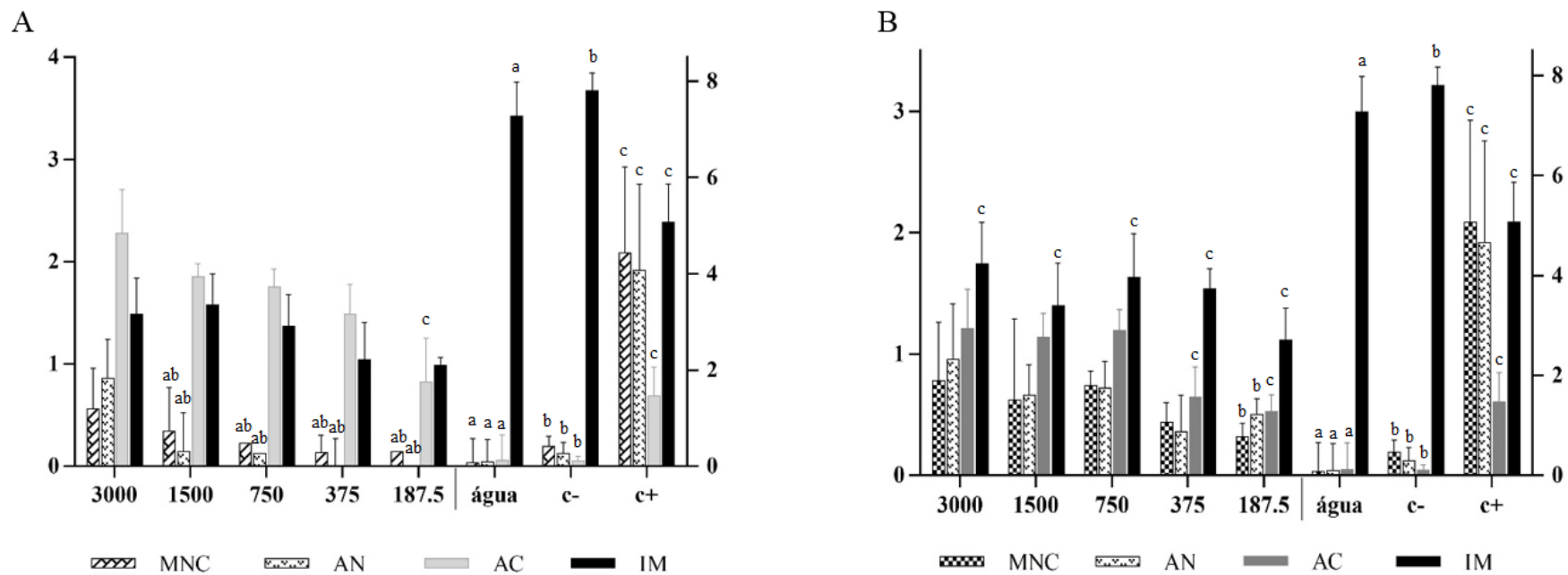


Figura 3. Análise de células radiculares meristemáticas de *Lactuca sativa* tratadas com diferentes concentrações (ppm dos óleos essenciais de (A) *S. botocudorum* e *S. tupaquinorum* (B), água, solvente (C-) e glifosato (C+). As médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra *b* se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra *c* se igualaram ao C+ glifosato. As cinco variáveis apresentadas são: IM- índice mitótico; AC- alterações cromossômicas, AN- alterações nucleares, MN- micronúcleo e MNC- alterações cromossômicas e nucleares. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em ppm, avaliadas dos óleos essenciais. Observa-se

que o eixo y a esquerda mostra os valores de MNC e MN e o eixo y a direita refere-se aos valores de AC e IM, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).

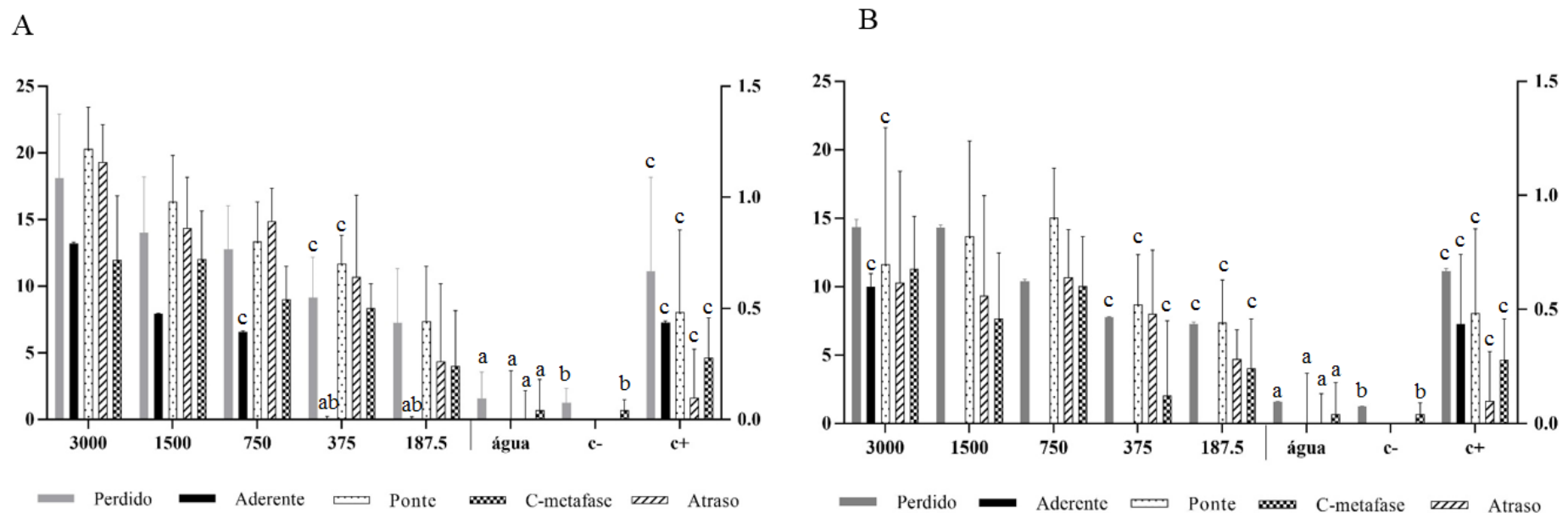


Figura 4. Análises das células meristemáticas das raízes de *Lactuca sativa*, encontradas nos óleos essenciais de *S. botocudorum* (A) e *S. tupiquinorum* (B), água, solvente (C-) e glifosato (C+), As médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato. As cinco variáveis apresentadas são: cromossomo

perdido, aderente, ponte em anáfase, c-metáfase e atraso em anáfase. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em ppm, avaliadas dos óleos essenciais. Observa-se que o eixo y a esquerda mostra os valores de perdido e aderente e o eixo y a direita refere-se aos valores de ponte, c-metáfase e atraso, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).

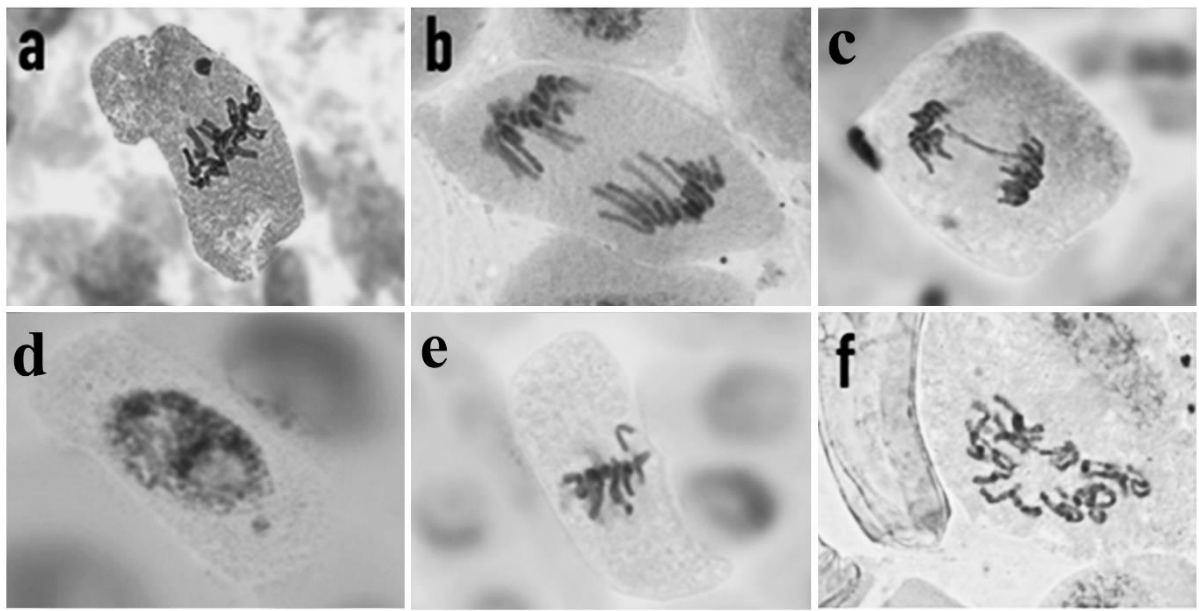


Figura 5. Alterações cromossômicas e nucleares: (a) micronúcleo em metáfase (b) atraso em anáfase, (c) ponte em anáfase, (d) micronúcleo em interfase, (e) cromossomo perdido e (f) c-metáfase, observadas nas células meristemáticas de alface tratadas com os óleos essenciais de *S botocudorum* e *S tupiquinorum* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 ppm.. Barra: 10 μ m

Discussão

Composição química dos óleos essenciais

Apesar dos estudos com o gênero *Sparattanthelium* serem escassos, a composição química é similar às espécies pertencentes as angiospermas basais, grupo em que esse gênero pertence, principalmente nas espécies do gênero *Hernandia*. Segundo Brophy e colaboradores (2000) as espécies *Hernandia albiflora*, *H. btvalvis*, *H. nymphaeifolia*, da família Hernandiaceae, apresentam em sua composição química biciclogermacreno, germacreno D e γ -Cadineno. Na espécie *Gyrocarpus amertcanus subsp. Amwlcanu* que pertencente ao gênero *Gyrocarpus*, possui como majoritário germacreno D com 31% de representatividade (Brophy et al., 2000). Esses dados mostram que dentro da família as espécies possuem similaridade na composição química. Além disso, existem espécies dentro de angiospermas basais que possuem composição química semelhante. Segundo Araujo e colaboradores (2001), a espécie *Ocotea puberula* da família Lauraceae, possui como componentes químicos de seu óleo essencial o biciclegermacreno, germacreno D, α cariofileno, β -elemeno, γ -cadineno e etc. Outros trabalhos feitos com a família Piperaceae, também pertencente as angiospermas basais, demonstraram que algumas espécies possuem a mesma composição química que as do presente estudo, diferenciando apenas o composto majoritário (Almeida et al.,2009).

O composto majoritário presente no óleo essencial das duas espécies (germacreno D) é encontrado em quase todas as angiospermas basais. Estudos com estas tem mostrado atividade larvicida (Castro et al.,2006), antibacteriana (Limberger et al.,2004; Duarte, 2006), fungicida (Almeida et al.,2005) e fitotóxica (Costa et al., 2009). Os demais compostos presentes também apresentam atividades biológicas, como o β -elemeno, composto majoritário de *Plantago major* L (Luz et al.,2012), que possui atividade bactericida, antifúngica e fitotóxica. O composto presente apenas na espécie *Sparattanthelium botocudorum*, trans-nerolidol apresenta atividade antileishmanial e também dificulta o crescimento de *Plasmodium falciparum*, um protozoário

causador da malária.

Estudos com espécies da família Lauraceae, sinalizam atividade citotóxica em células tumorais. Este potencial pode ser devido ao composto presente no grupo, o biciclogermacreno (Amaral et al., 2014). Este atua nas células induzindo a apoptose. No presente trabalho, as espécies possuem este composto em sua composição química, podendo ter influenciado nos resultados, uma vez que os compostos podem ter efeito sinérgico.

Identificar a composição química de angiospermas basais pode mostrar caminhos evolutivos e entendimento sobre sua filogenia. Além disso, estudos sobre a composição química podem indicar o comportamento das espécies em seu habitat e mecanismos de proteção contra herbívoros, podendo condicionar o seu desenvolvimento e capacidade adaptativa. Portanto, estudar a constituição química e biológica de espécies do gênero *Sparattanthelium* são importantes para posteriormente entender sua ação farmacológica, visto que existe escassez de informações sobre o grupo e por algumas espécies serem empregadas na medicina popular e as plantas serem encontradas na biodiversidade do território nacional.

Fitotoxicidade

Interessante ressaltar que os óleos essenciais das duas espécies foram mais eficientes na inibição de variáveis relacionadas com a germinação de alface e sorgo do que o herbicida comercial testado (glifosato), evidenciando o potencial bioherbicida. Além disso, algumas variáveis apresentaram médias semelhantes estatisticamente ao controle positivo. A principal vantagem do uso das espécies modelo, alface e sorgo, nos estudos alelopáticos, é a sensibilidade nas respostas mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos (Souza et al., 2005).

Estudos relatam que os aleloquímicos, quando liberados em quantidades suficientes, causam efeitos que podem ser observados na germinação e no desenvolvimento dos sistemas

radiculares e aéreos das espécies avaliadas (Carvalho,1993), corroborando com os resultados aqui obtidos. A interferência no processo de germinação pode afetar no crescimento e desenvolvimento radicular de plantas (Souza et al., 1997). No início do processo germinativo, o ciclo do glioxalato se inicia mobilizando na fase inicial da germinação, onde enzimas atuam aumentando o metabolismo de lipídios que são armazenados nos tecidos de germinação, favorecendo o desenvolvimento da planta (Gniazdowska e Bogatek, 2005).

A composição química influencia na atividade biológica dos óleos essenciais. Segundo Sampietro (2008) os terpenoides são inibidores de crescimento; monoterpenos e sesquiterpenos possuem atividade como inibidores de crescimento aéreo e de crescimento radicular sobre diversas espécies vegetais. Os monoterpenos podem atuar na integridade da membrana celular, provocando uma mudança no estado de fluidez. De acordo com Zunino e Zygodlo (2004), estes atuam nos fosfolipídios da membrana, aumentando a razão entre os ácidos graxos insaturados e os saturados, o que determina na alteração do arranjo físico da membrana. No presente estudo, os óleos apresentaram a diminuição dessas variáveis em algumas concentrações e isto pode ser devido a sua composição química que é composta por sequiterpenos e monoterpenos. Outra classe de compostos são os alcaloides, presente na maioria das espécies de angiospermas basais. Em estudos com espécies do gênero *Ocotea* da família Lauraceae, seu óleo essencial a composição química rica em alcaloides que podem estar relacionados com as atividades fitotóxicas, larvicidas e antibacterianas (Zanin e Lordello, 2007).

Os alcaloides isolados de *Guatteria* sp, pertencente à família Annonaceae, possuem atividades antitumoral, antimalárica, antifúngica e mutagênica (Ferreira 2016). Esta relação entre a composição química e a atividade biológica das espécies de angiospermas basais, pode estar relacionada com os alcaloides presentes, pois estes são produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal, atuando como agentes alelopático, que podem inibir a germinação devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico,

embora existam poucas evidências (Henriques et al., 2001).

A variável germinação não apresentou resultado significativo para os óleos essenciais de *Sparattanthelium botocudorum* e *Sparattanthelium tupiquinorum*. Para Ferreira e Aquila (2000) os efeitos dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária as mudanças anteriores. Assim, os estudos realizados sobre o efeito dos aleloquímicos sobre a germinação e desenvolvimento de plantas, são manifestações secundárias de efeitos ocorridos a nível celular. Ou seja, nem sempre a germinação e sua velocidade podem confirmar seu efeito alelopáticos e sim o conjunto macroscópico e o microscópico.

A maioria dos trabalhos que estudam o efeito alelopático de espécies vegetais avaliam bioensaios visando principalmente o efeito sobre a germinação e crescimento inicial de organismos-teste (Bonfin et al., 2013; Lima et al., 2013; Rosa et al., 2013; Silveira et al., 2014). Entretanto, muitos dos efeitos visíveis nessas variáveis são sinais secundários de mudanças ocorridas no DNA que podem ser identificadas tanto em ensaios citotóxicos quanto citogenéticos (Prates et al., 2001).

Citotoxicidade

O índice mitótico, as alterações nucleares e cromossômicas estão intimamente relacionadas com os parâmetros macroscópicos e de desenvolvimento, uma vez que o crescimento do órgão de uma planta está relacionado com o número de células produzidas durante divisão celular e do alongamento celular durante o processo de diferenciação e desenvolvimento (Aragão et al., 2015).

As alterações nucleares podem ser expressas tanto por frequência de micronúcleo quanto por núcleos condensados. Entretanto, apesar da presença de ambos, observou-se com maior frequência os micronúcleos. Segundo Palmieri et al (2016), estes estão relacionados a

cromossomos perdidos ou fragmentados que não incorporaram ao núcleo principal da célula até ao final da divisão celular. Isso mostra o mecanismo de reparo da célula quando é visível o dano sofrido, este mecanismo elimina o material genético da célula, formando os micronúcleos (Andrade-Vieira, 2012; Aragão et al., 2015). A partir da frequência de AC é possível avaliar o mecanismo de ação dos compostos presentes nos óleos essenciais no ciclo celular, que pode ser clastogênico ou aneugênico. Assim, a presença de pontes e dos fragmentos cromossômicos, demonstram o efeito clastogênico, ou seja, a ação das molécula diretamente no DNA do indivíduo (Fernandes et al., 2009; Aragão et al., 2015; Bernardes et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Alves et al., 2018; Santos et al., 2018).

As AC como cromossomos ou fragmentos perdidos podem dar origem aos micronúcleos, sendo verificadas, no presente trabalho, a correlação entre a presença de micronúcleos e de cromossomos perdidos. Estudos realizados por Oliveira (2012), mostraram que a frequência de micronúcleo observada em células do meristema radicular de *Allium cepa* indica a presença de substâncias aneugênicas (inibidoras das fibras do fuso acromático). Essas alterações estão intimamente relacionadas com as repostas morfológicas das plantas, bem como seu crescimento, desenvolvimento e fotossíntese. Estas, atuam diretamente no DNA, inibindo o mecanismo de reparo da célula.

A ocorrência de pontes cromossômicas acontecem quando os cromossomos são arrastados pelos seus centrômeros para os polos celular (Figura 5c), por meio da despolimerização dos filamentos de alfa e beta tubulina, ocorre novamente a quebra de cromossomos formando novos fragmentos cromossômicos, possibilitando nova fusão e futuras quebras (Silveira et al., 2017).

O atraso em anáfase está relacionada com a despolimerização dos microtúbulos, determinando em um arrastamento desigual dos cromossomos. Além disso, faz com que a célula tenha um envoltório nuclear deformado, visando envolver todo o material genético a ele

e posteriormente essa deformação é desfeita (Fernandes et al., 2009). Nas c-metáfases, os microtúbulos são inativados completamente, impedindo a formação do fuso (Costa et al., 2017; Santos et al., 2018), ou seja, o fuso mitótico se torna completamente inativado, desorganizando a formação da placa equatorial, e isso impede ou ocasiona atraso na divisão do centrômero (Costa et al., 2017; Santos et al., 2018). A presença contínua de células em C-metáfase pode conduzir essas células a uma duplicação no número de cromossomos.

Segundo Almeida e colaboradores (2014), espécies do gênero *Annona* L., pertencente à família Annonaceae, descrevem que os extratos testados em bioensaios tiveram um efeito citotóxico moderado, com uma inibição 50 a 75% do índice mitótico. Apesar de terem usado extrato ao invés de óleo essencial, os estudos mostraram que os óleos essenciais dessas espécies possuem atividade biológica, citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífida, antimicrobiana, imunossupressora, inibidora do apetite e antimalárica (Costa et al., 2011).

Os trabalhos realizados com as duas espécies do gênero *Sparattanthelium*, permitem inferir que as espécies do presente estudo provavelmente possuem atividades biológicas e composição química semelhantes com as demais espécies do gênero que foram estudadas. Isto reforça que a composição química em plantas, varia de órgão para órgão e que os compostos podem atuar em diversas atividades biológicas, como larvífida, herbífida, antitumoral.

Conclusão

Os óleos essenciais de *S botocudorum* e *S tupiquinorum* apresentaram efeitos fitotóxicos e mecanismos de ação aneugênicos e clastogênicos promovendo danos ao fuso mitótico e no DNA. Deste modo, os óleos essenciais das espécies do presente estudo exibem potencial bioherbicida. Estudos como este são importantes na escolha de novas substâncias com potencial para atividades biológicas. Esses dados somados a caracterização de outras espécies do gênero podem auxiliar no entendimento das delimitações taxonômicas das espécies.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Brasília-DF, Brasil, código 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória - ES, Brasil) pelo apoio financeiro.

Referências

Aniszewski, Tadeusz. 2007. Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier.

Al-Shatti, Aisha H. et al. 2014. The Allelopathic Potential of *Conocarpus lancifolius* (Engl.) Leaves on Dicot (*Vigna sinensis* L.), Monocot (*Zea mays* L.) and Soil-Borne Pathogenic Fungi. American Journal of Plant Sciences, v. 5, n. 19, p. 2889 < doi: 10.4236/ajps.2014.519304 >

Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/mass Spectroscopy. EUA: Allured Publishing Corporation 804p.

Almeida, L.; Delachiave, ME A.; Marques, M., 2005. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L.-Lamiaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, p. 35-38.

Almeida, V.P.; Figueiredo. Ribeiro, C.L.F. 1986. Análise enzimática e quimiotaxomina de duas variedades de *Ocimum nodicaule*. Revista Brasileira de Botânica, v.9, p.75-80.

Almeida, J. R G da S et al. 2014. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. SPE1, p. 258-264 < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500030>>.

Alves, T. A.; Pinheiro, P. F.; Fontes, M. M. P; Vieira, L. F. A; Corrêa, K. B.; Alves, T. A.; da Cruz, F. A.; Lacerda Júnior, V.; Ferreira, A.; Soares, T. C. B., 2018. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxy acetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. Industrial Crops and Products. v. 114, p. 59-67.< <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.071>>

Amaral, L. P et al. 2014. Caracterização química e avaliação biológica do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.< <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/3779>>

Andrade-Vieira, L. F., Gedraite, L. S., Campos, J. M. S., Davide, L. C., 2011. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. Ecotoxicology and Environmental Safety. v.74, p. 882–888 < <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.010>>

Andrade-Vieira, L. F.; Campos, J. M. S.; Davide, L. C., 2012. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. Journal of Environmental Management. v. 107, p. 140–146.< <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.008>>

Aragão, F. B., Andrade-Vieira, L. F., Ferreira, A., Costa, A. V. Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., 2015. Phytotoxic and Cytotoxic Effects Of Eucalyptus Essential Oil On *Lactuca Sativa* L. Allelopathy Journal. V. 35, P. 259-272.

Aragão, F. B.; Queiroz, V. T.; Ferreira, A.; Costa, A. V.; Pinheiro, P. F.; Carrijo, T. T.; Andrade-Vieira, L. F., 2017. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). Revista de Biologia Tropical. v. 65, p. 1-10. Bila, D. M.; Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Quim. Nova, v. 30, n. 3, p. 651-666.< [doi 10.15517/rbt.v65i2.25696](https://doi.org/10.15517/rbt.v65i2.25696)>

Beltrame, J. M.; Lobo, V. DS.; Dotto, F.; Marques, K. B.; Angnes, R. A. 2010. Estudo de obtenção de óleos essenciais de fatores em sua composição. Anais do II ENDICT–Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, p. 2176-3046.

Bernardes, P. M.; Andrade-Vieira, L. F.; Aragão, F. B.; Ferreira, A.; Ferreira, M. F. S. 2015. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. Water, Air and Soil Pollution (Dordrecht. Online). v. 226, p. 207-218 < <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2462-y>>.

Bonfim, F. P. G. et al. 2013. Efeito de extratos aquosos de funcho na germinação e vigor de sementes de alface e salsa. *Ciências Agrárias e Biológicas*.v. 7, n. 3, p. 218-222.

Brophy, J. J., Goldsack, R. J., Forster, P. I., 2000. Leaf essential oils of the Australian species of *Gyrocarpus* and *Hernandia* (Hernandiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 12, n. 6, p. 717-722 < <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712199>>

Carvalho, S.I.C., 1993. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizanthacv.* Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. 85 Bandeirante. (Dissertação Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Agrárias.) Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 72p.

Castro, D. P. et al., 2006. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 4, p. 27-32.

Chalandre, M.C., Jacquemin, H., Bruneton, J., 1985. Alcaloides Isoquinoleiques de *Sparattantbelium uncigerum*. *Journal of Natural Products*, v. 48, n. 2, p. 333-333 < DOI: 10.1021/np50038a030>.

Conserva, L. M., Cynara A.B.P., Barbosa-Filho, J.M., 2005. Alkaloids of the Hernandiaceae: Occurrence and a compilation of their biological activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, v. 62, p. 175-243 < [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(05\)62003-2](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(05)62003-2)>

Costa, E. V.; Dutra, L. M.; Jesus, H. C. R.; Nogueira, P. C. L.; Moraes, V. R. S.; Salvador, M. J.; Prata, A. P. N. 2011. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 34.

Costa, A. V.; Oliveira, M. V. L., Pinto, R. T., Moreira, L. C., Gomes, E. M. C., Alves, T. A., Pinheiro, P. F., Queiroz, V. T., Andrade-Vieira, L. F., Teixeira, R. R., J Júnior, W. C. 2017. Synthesis of Novel Glycerol-Derived 1, 2, 3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicide, Phytotoxic and Cytotoxic Activities. *Molecules*, v. 22, n. 10, p. 1666.

Da Costa, G. M. et al, 2009. Chemical composition, evaluation of antibacterial activity and toxicity of the essential oils from *Lantana camara* L. and *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 710-714.

Cruz, C. D., 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy (Online)*, 35, 271-276.

De Almeida, J. G. L. et Al., 2009. Essential Oil Composition From Leaves and Fruits of *Piper divaricatum* G. Mey. *Journal of Essential Oil Research*, v. 21, n. 3, p. 228-230 <<https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700155>>.

De Araujo, A. J., Lordello, A. L. L., Maia, B. S., 2001. Análise Comparativa dos Óleos Essenciais de Folhas e Galhos de *Ocotea Puberula* (Lauraceae). *Visão Acadêmica*, v. 2, n. 2.

Demyttenaere, J. C. R.; Kimpe, N. 2001. Biotransformation of terpenes by fungi. *Study of*

the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, n. 4-6, p. 265-270, 2001

Duarte, M.C.T., 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista MultiCiência*, v. 7, n. 1, p. 1-16.

El-Sayed, A.M., 2016. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. (Accessed 1o October 2016). <http://www.pherobase.com>

Felito, R. A. et al., 2016. Atividade potencialmente alelopática de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *solanum aculeatissimum* Jacq. *Cadernos de Agroecologia*, v. 10, n. 3. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/19970>

Ferreira, A. G., Aquila, M. EA., 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 1, p. 175-204.

Ferreira, Agnieszka Katarzyna Rajca, 2016. Análise química e atividades biológicas de *Guatteria elliptica* RE Fries (Annonaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D. E. C.; Morales, M. A.M., 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology Environmental Safety*. v. 72, n.6, p.1680–1686 < <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>>

Freire, J. M.; Cardoso, M. G.; Batista, L. R.; Andrade, M. A. 2011. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 2, p. 209-214.

Freitas, A. S.; Cunha, I. M. F.; Andrade-Vieira, L.F.; Techio, V. 2016. 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 <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>>

Gniazdowska, A.; bogatek, R., 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiology Plant*, v. 27, n. 3, p. 395-407.

Henriques, A T et al., 2010. Alcalóides: generalidade e aspectos básicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre. Editora UFRGS, 1104p.

Inca. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Acercados Agrotóxicos*. 2015 Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acessado em: 26 de Jan. de 2017.

Kubitzki, K. 1969. Monographie der Hernandiaceen. *Botanische Jahrbücher für Systematik*. 69: 78-209.

Lima, C. P. et al. 2013. The allelopathic and antifungal potentials of extract from leaves

Acacia longifolia (Andr.) Willd. *Visão Acadêmica*, v. 14, n. 4, p. 16-25 < Doi: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v14i4.32706> >

Limberger, R.P et al., 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química nova*. São Paulo. Vol. 27, n. 6 (2004), p. 916-919.

Mchugh, M. L. 2011. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochemical Medicine*, 21(3), 203–209.

Mendes, K. F. et al., 2018. Impacto do biochar no comportamento de herbicidas em solos: um enfoque no Brasil. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 17, n. 1, p. 106-117 <doi: <https://doi.org/10.7824/rbh.v17i1.551>>

Munoz, V. et al., 1999. Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)-roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta medica*, v. 65, n. 05, p. 448-449, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. vol 2 < doi: 10.1055/s-2006-960808 >.

Nist, 2011. Standard reference database 69. NIST Chemistry WebBook. National Institute of Standards and Technology (Accessed 21 January 2016). <http://webbook.nist.gov/chemistry>

Oliveira, H. Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1-8, 2012. doi: 10.1155/2012/375843

Palmieri, M J et al., 2016. Cytogenotoxic effects of spent pot liner and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water, Air soil Pollut.*

Amsterdam, V 227, n5 < <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2809-z> >.

Pena, L A; Avella, Eliseo; Diaz, A P. 2000. Benzoquinona e hidroquinona preniladas y otros constituyentes aislados de Piper Bogotense C. DC. Revista Colombiana de Química, v. 29, n. 2, p. 25-37 < Doi: 10.15446/rev.colomb.quim >.

Pinheiro, P. F.; Costa, A. V.; Alves, T. A.; Galter, I. N.; Pinheiro, C. A.; Pereira, A. F.; Oliveira, C. M. R.; Praça-Fontes, M. M., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 63, p. 8981-8990 < doi: 10.1021/acs.jafc.5b03049 >

Prates, H. et al. 2001. Efeito do extrato aquoso de leucenana germinação e no desenvolvimento do milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, n. 1, p. 909-914.

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

Rumjanek, V. M., Braz-Filho, R., 1991. Botocudorol, a New Bisabolene Type nor-Sesquiterpenoid from *Sparattanthelium botocudorum*.

Sampietro, D. A. Alelopatia: concepto, características, metodología de estudio e importância. 2008. Disponível em: <<http://fai.enne.edu.ar/biologia/alolepatia/alelopati.htm>>.

Santos, F. E.; Carvalho, M. S. S.; Silveira, G. L.; Correa1, F. F.; Cardoso, M. G.; Andrade-

Vieira, L. F.; Vilela, L. R. 2018. 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<
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1015-x>>

Silveira, B. D. et al. 2014. Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze allelopathic activity on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. Ciência Florestal, v. 24, n. 1, p. 79-85<
<http://dx.doi.org/10.5902/1980509813325>>

Silveira, G. L.; Lima, M. G. F.; Reis, G. B.; Palmieri, M. J.; Andrade- Viera, L. F. 2017. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. Chemosphere. v. 178, p. 359–367.

Silveira, G. L.; Lima, M. G. F.; Reis, G. B.; Palmieri, M. J.; Andrade- Viera, L. F. 2017. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. Chemosphere. v. 178, p. 359–367< <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>>.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., 2010. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ DaUniversidade Federal de Santa Catarina, 1102 p.

Souza Filho, A.P.; Rodrigues, L.R.A.; Rodrigues, T.J.D., 1997. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. Pesquisa

Agropecuária Brasileira, v. 32, n.2, p.165-170.

Souza M T M.; Salgado, H R N; Pietro, R C L R. 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 435-440<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300023>>.

Souza et al.,2005. Trypanocidal activity of (-)- cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanossoma cruzi*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 15,303-307.

Souza F, A. P. S., Santos, R. A., Santos, L. S., Guilhon, G. M. P., Santos, A. S., Arruda, M. S. P & Arruda, A. C., 2006. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. Planta daninha, 24(4), 649-656< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000400005>>

Wardle, D. A. et al., 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. Trends in ecology & evolution, v. 26, n. 12, p. 655-662 < <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.08.003>>.

Yamaguchi, Lydia F. et al. 2011. Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from Piper species. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 22, n. 12, p. 2371-2382.

Zanin, S. M. W., & Lordello, A. L. L. 2007. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, 30(1), 92.

Zunino, M. P., & Zygodlo, J. A., 2004. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, 219(2), 303-309

