

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS**

**Relação do fluxo de íons ( $H^+$ ) em raízes com as atividades  
alelopáticas e mutagênicas do extrato etanólico e da  
nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng.**

VITÓRIA - ES  
2019

MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS

**Relação do fluxo de íons ( $H^+$ ) em raízes com as atividades alelopáticas e mutagênicas do extrato etanólico e da nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Coorientador(a): Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos

VITÓRIA - ES  
2019

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

---

F224r FARIAS BARCELOS, MONIQUE ELLEN, 1987-  
RELAÇÃO DO FLUXO DE ÍONS (H<sup>+</sup>) EM RAÍZES COM AS ATIVIDADES ALELOPÁTICAS E MUTAGÊNICAS DO EXTRATO ETANÓLICO E DA NANODISPERSÃO DE MIKANIA GLOMERATA SPRENG. / MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS. - 2019.  
107 f. : il.

Orientadora: MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. MUTAGENESE. 2. ALELOPATIA. 3. FLUXO DE ÍONS PROTONS. 4. ALLIUM CEPA. 5. LACTUCA SATIVA. 6. NANODISPERSÃO. I. PIMENTEL BATITUCCI, MARIA DO CARMO. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---

Monique Ellen Farias Barcelos

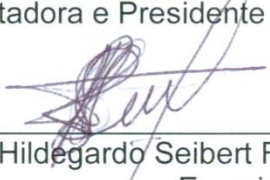
**“Relação do fluxo de íons (H<sup>+</sup>) em raízes com as atividades alelopáticas e mutagênicas do extrato etanolico e da nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng.”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)  
Orientadora e Presidente da Comissão

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (IFES)  
Examinador interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elias Terra Werner (UFES)  
Examinador interno

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Geralda Gillian Siva Sena (UFES)  
Examinada externa

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Juliana Macedo Delarmelina (IFES)  
Examinada externa

Aos meus pais Jair e Zenilda  
Em especial, Thales, Brenda, Pedro, Ana Bratriz e Ester (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, aos meus pais Jair e Zenilda por todo o apoio ao longo desta jornada. Aos demais familiares, irmãos e cunhadas por toda compreensão neste caminho, em especial, os meus sobrinhos Thales, Brenda, Pedro e Ana Beatriz por terem me proporcionado momentos especiais, desde o nascimento, até o presente, amo vocês.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que, ao longo destes quatro anos, tivemos bons momentos a serem lembrados: hora do café que se tornaram nossas reuniões particulares, momentos de descontração durante o experimento, piadas internas, “Nutela”, e externas, meu café que se tornou “Cháfé”. Enfim, tudo que possamos lembrar com carinho que o tempo que passei ali, dedicando-me foi envolvido de amor e carinho por vocês! Obrigada!

A minha orientadora, Dona Chefa, Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, por toda a orientação ao longo destes quatro anos, amizade, respeito, conversas, orientações, discussões sobre novelas, filmes e séries! Afinal, não é só de artigos que se vive nesta pós-graduação! Obrigada por todos os momentos de descontração e zelo.

Aos amigos que acabaram, com o tempo, ficando um pouco distantes, mas saibam que a distância é momentânea, tudo foi uma questão de foco e realizações para se alcançar um objetivo, muito obrigada Monique e Geiza por serem duas pessoas ímpares e, em meio às dificuldades, sabemos que o amor vence no final. Sempre. À Georgette, todo o meu carinho e respeito! Afinal, se não fosse você em 2013, eu não teria tido incentivo de fazer a prova de Mestrado e, assim, não teria chegado tão longe! Meu muito obrigado!

Meu amigo, irmão, companheiro de vida Felipe Rangel Aleluia, por ser este amigo maravilhoso, amoroso, aconselhador, dedicado e, mesmo longe sempre, faz-se presente na minha vida com chamadas de vídeo no meio da tarde e à noite para saber se está tudo bem, ou para me contar algo novo! A gente se conhece há tantos anos e, a cada dia que passa, sabemos mais o valor da nossa amizade, obrigada pelo seu zelo comigo, seu carinho e dedicação. Muito obrigada!

As minhas amigas eternas, Lorena e Francielle que, desde a faculdade, acolheram-me nesta amizade maravilhosa, passamos por muitos momentos juntas, risadas, histórias e, hoje, estou me tornando doutora para completar este trio de doutoras! Obrigada por todo o incentivo, carinho e amor pela nossa amizade. Mesmo passando

os anos e, cada uma para um lado, não deixamos acabar o que é mais importante em nós, a nossa amizade. Muito obrigada!

Aos amigos da UENF, meu muito obrigado por todo carinho, compreensão, ajuda nas análises, por me ouvirem, quando mais precisei! Obrigada em especial à Amanda e ao Lucas por cederem sempre espaço na casa e por me ajudarem tanto nesta caminhada. Obrigada também ao Sávio e Fred. Sem esquecer a Inga, das nossas conversas de apoio, dos conselhos alguns amorosos e muitos não, obrigada por me receber sempre de braços abertos. Obrigada a todos da UENF por me receberem tão bem ao longo destes quatro anos.

Agradecimento em especial ao prof. Dr. Alessandro Ramos Coutinho, pela co-orientação, conversas e muitos conselhos. É chegada a hora de “largar a mochila e pegar a maleta” e seguir meu caminho com dedicação e muito foco. Muito obrigada! Agradecer a UENF pelos laboratórios e pela disponibilidade de análises a mim concedidas e por todo apoio.

A Universidade Federal do Amapá, por me conceder a Nanodispersão, e pelo Prof. Caio pela disponibilidade.

Ao Prof. Hildegardo, pelas análises de teores da Nanodispersão no IFES e a Poliana por ter realizado as análises e me ensinado tanto!

Agradecer ao Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, pela infraestrutura para minhas análises e aulas. Aos colegas de curso, funcionários da UFES e aos professores do programa pelas aulas ministradas

À FAPES pela bolsa concedida e taxa de bancada para realização das análises em outro Estado e eventual necessidades ao longo do projeto.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do metabólito secundário cumarina, presente em <i>Mikania glomerata</i> (CZELUSNIAK et al., 2012, adaptado).....	25
Figura 2: Três classes de proteínas transportadoras de membrana: (A) canais, (B) carreadoras e (C) bombas. Proteínas canais e carreadoras podem mediar o transporte passivo de soluto pela membrana (por difusão simples ou difusão facilitada) a favor do gradiente de soluto e potencial eletroquímico. (A) Proteínas canais agem como poros nas membranas e sua especificidade é determinada primeiramente pelas propriedades biofísicas no canal. (B) Proteínas carreadoras se ligam na molécula a ser transportada em um lado da membrana e depois a liberam do outro lado. (C) O transporte ativo primário é realizado pelas bombas e usam energia diretamente, usualmente da hidrólise do ATP, para bombear os solutos contra o seu gradiente ou potencial eletroquímico (TAIZ; ZEIGER, 2017).....	32
Figura 3: Energia na membrana plasmática produzida por H <sup>+</sup> _ATPase. Iniciando o gradiente eletroquímico (prótons) através da membrana plasmática (HARUTA et al., 2015).....	35
Figura 4: Esquema demonstrando transporte primário e secundário através de membranas biológicas de células vegetais (MORSOMME; BOUTRY, 2000, adaptado).....	36
Figura 5: Foto da raiz de <i>Allium cepa</i> (5mm de comprimento) fixada à placa de petri para medição do fluxo de iônico. Ainda sem o meio mínimo de medição (Foto: Arquivo pessoal).....	49
Figura 6: Momento da confecção dos microelétrodos de borossilicado a partir do equipamento <i>Puller Flaming Brown, Sutter P-98</i> ( <i>Sutter Instruments</i> , Novato, CA) (Foto: Arquivo pessoal).....	49
Figura 7: Momento de preenchimento do eletrodo com solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.0, para H <sup>+</sup> ; 100 mM KCl para ânions e potássio; 100 mM CaCl <sub>2</sub> para Ca <sup>2+</sup> ) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo (Foto: Arquivo pessoal).....	50



Figura 8: Momento do preenchimento da ponta do eletrodo com uma coluna de 20 a 25 $\mu\text{m}$ do respectivo coquetel seletivo, com auxílio de um microscópio para suporte visibilidade da ponta (Foto: Arquivo pessoal)....	50
Figura 9: Momento da colocação do minieletrodo no equipamento para captação dos íons de forma tridimensional (Foto: Arquivo pessoal).....	51
Figura 10: Visão do <i>software</i> ASET no momento da captação dos íons pelo minieletrodo (Foto: Arquivo pessoal).....	52
Figura 11: visão ampla do equipamento onde está localizado o minieletrodo para captação do fluxo de íons e do <i>software</i> ASET que captura as informações em tempo real (Foto: Arquivo pessoal).....	52
Figura 12: Esquema do tratamento descontínuo, onde nas etapas de 24h, 48h e Recuperação parte das raízes submetidas eram retiradas e fixadas em Carnoy para posterior análises mutagênicas.....	54
Figura 13: Fluxos de $\text{H}^+$ (A) e médias dos valores de pH da superfície radicular (B) detectados na zona de alongamento da raiz principal de <i>Allium cepa</i> com diferentes concentrações (mg/mL) de extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> (guaco) adicionadas gradualmente no momento da medição. Valores em laranja representam a referência do meio de medição. CN (Controle Negativo = 0,0 mg/mL).....	57
Figura 14: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de $\text{H}^+$ (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de <i>Allium cepa</i> . O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> (guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL).....	58
Figura 15: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de $\text{H}^+$ (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz	

principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (Guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL)..... 59

Figura 16: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 48h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (Guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL)..... 60

Figura 17: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – recuperação. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL)..... 61

Figura 18: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo contínuo..... 62

Figura 19: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz

principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h..... 63

Figura 20: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 48h..... 64

Figura 21: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo - recuperação..... 65

Figura 22: Índice de velocidade de germinação do do cultivar *Lactuca sativa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*..... 69

Figura 23 : Crescimento radicular médio (CRM) e índice da velocidade crescimento radicular (IVCR) do cultivar *Lactuca sativa*, em resposta tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumar mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*..... 70

Figura 24: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro

concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	72
Figura 25: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	73
Figura 26: Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) do cultivar <i>lactuca sativa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	73
Figura 27: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	75
Figura 28: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	76
Figura 29: Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	76
Figura 30: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro	

concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	78
Figura 31: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar <i>Allium cepa</i> , em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	78
Figura 32: A) Índice mitótico B) Índice efeito aneugênico C) Índice efeito clastogênico. Em sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - mms (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de <i>Mikania glomerata</i> .....	79
Figura 33: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco ( <i>M. glomerata</i> ) em ensaio de <i>Allium cepa</i> . Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP).....	80
Figura 34: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de guaco ( <i>M. glomerata</i> ) em ensaio de <i>Allium cepa</i> . Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP).....	81
Figura 35: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de Guaco ( <i>M. glomerata</i> ) em ensaio de <i>Allium cepa</i> . Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito	

Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP)..... 82

Figura 36: A) Índice mitótico B) Índice efeito aneugênico C) Índice efeito clastogênico. Em sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - MMS (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de *Mikania glomerata*..... 82

Figura 37: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP)..... 83

Figura 38: Índice efeito clastogênico. Em sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - MMS (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de *Mikania glomerata*..... 84

Figura 39: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Cumarina Pura 0,002mg/mL (CuP)..... 85

Figura 40: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco ( <i>M. glomerata</i> ) em ensaio de <i>Allium cepa</i> . Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Cumarina Pura 0,002mg/mL (CuP).....	86
Figura 41: H <sup>+</sup> _ATPase. A bomba inserida na membrana, (A) liga-se ao próton do lado interno da célula e (B) é fosforilada por ATP. (C) Essa fosforilação conduz a uma mudança de conformação que expõe o próton ao exterior da célula e possibilita sua difusão para longe. (D) A liberação do íon fosfato (Pi) da bomba no citosol restaura a configuração da H <sup>+</sup> _ATPase e permite que comece um novo ciclo de bombeamento (TAIZ et al., 2017).....	88
Figura 42: Dependência do ciclo oxidativo fotossintético C <sub>2</sub> do carbono no metabolismo do cloroplasto. Fornecimento de ATP e equivalentes redutores a partir das reações da luz nas membranas tilacóides é necessário para o funcionamento do ciclo oxidativo fotossintético C <sub>2</sub> (TAIZ et al., 2017).....	90
Figura 43: Modelo de regulação do ácido abscísico e giberelina, da dormência e germinação em resposta a fatores ambientais (TAIZ et al., 2017).....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção relativa dos constituintes das diferentes dispersões aquosas de tensoativos empregadas na preparação das nanodispersões de <i>Mikania glomerata</i> .....	46
Tabela 2: Índice de alelopatia para as sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 mg/mL <sup>-1</sup> de extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> (guaco).....	68
Tabela 3: Índice de alelopatia para as sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de nanodispersão de <i>Mikania glomerata</i> (guaco).....	71
Tabela 4: Índice de alelopatia para as sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 mg/mL de extrato etanólico de <i>Mikania glomerata</i> (guaco).....	74
Tabela 5: Índice de alelopatia para as sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de nanodispersão de <i>Mikania glomerata</i> (guaco).....	77



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Caracterização físico-química e organolépticas da cumarina simples (1,2 benzopirona).....	28
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>H<sup>+</sup>PPase</b>	Pirofosfatase de prótons.
<b>H<sup>+</sup>_ATPase</b>	Bomba de prótons, proteína integral de membrana que funciona a partir da hidrólise de ATP em ADP e fosfato (transporte ativo).
<b>H<sup>+</sup>-VATPase</b>	Enzima que acidifica organelas celulares e bombeia prótons através da membrana plasmática.
<b>P_ATPase</b>	Grupo de bombas de íons e lipídios, que são transportadores primários.
<b>CN</b>	Controle negativo.
<b>CP</b>	Controle positivo.
<b>CuP</b>	Cumarina pura (0,002 mg/mL).
<b>%IG</b>	Porcentagem do índice de germinação.
<b>IVG</b>	Índice de velocidade de Germinação.
<b>CRM</b>	Crescimento radicular médio.
<b>IVCR</b>	Índice de velocidade de crescimento de raíz.
<b>PSII</b>	Fotossistema II.
<b>H<sup>+</sup></b>	Prótons.
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio.

## RESUMO

A *Mikania glomerata* Spreng é uma espécie muito estudada sobre o aspecto etnofarmacológico e produção de compostos secundários, como as cumarinas. Esses compostos vêm sendo associados ao uso de nanopartículas as quais são utilizadas para associar compostos ativos vegetais, pouco solúveis, aumentando mais a biodisponibilidade desses. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade iônica do extrato e nanodispersão do teor de cumarina (0,001; 0,002; 0,004; 0,008 e 0,016 mg/mL) de *Mikania*, relacionando essa capacidade com uma potencial atividade alelopática e mutagênica em raízes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. O fluxo de H<sup>+</sup> foi determinado na zona de alongamento das raízes, usando sistema vibratório de íons seletivos. A atividade alelopática foi avaliada por meio de ensaio de germinação. Após sua protrusão, as raízes foram fotografadas e analisadas em *software* ImageJ. Para avaliar a atividade mutagênica, as sementes foram germinadas em placas de Petri em triplicata e receberam 5mL de extrato de *Mikania* nas mesmas concentrações utilizadas para a nanodispersão, além dos grupos: cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP); controle positivo metilmetanosulfonato a  $4 \times 10^{-4}$ M (MMS) - como controle positivo - e o controle negativo (água destilada). Após a protrusão das raízes, foram confeccionadas lâminas para análise do índice mitótico e possíveis anomalias cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e teste de médias ( $p < 0,05$ ). O fluxo de H<sup>+</sup>, na curva dose-resposta, apontou a concentração de 0,002 mg/mL, sendo a melhor concentração para comparação aos demais tratamentos. Foi possível, também, observar que todos os tratamentos promoveram inibição do fluxo de H<sup>+</sup>, quando comparados ao controle negativo. De forma similar, foi encontrado no fluxo de teores de cumarina em nanodispersão, em que foi possível evidenciar uma oscilação, de acordo com as concentrações analisadas. Esse resultado pode estar relacionado à inibição da germinação de sementes, diferenciação celular anormal e redução do crescimento das plantas. Nas análises de atividade alelopática, foi observado que a *Lactuca sativa* apresentou uma maior queda na porcentagem de germinação e aumento mais expressivo do índice de alelopatia, quando comparada ao *Allium cepa*, na concentração de 0,004mg/mL de teor de cumarina no extrato. No entanto, para o ensaio com nanodispersão, foi evidenciado que, em ambos os organismos testes, houve uma queda significativa da germinação e/ou inibição da germinação, quando comparada ao controle, proporcionando maior atividade alelopática. Quanto à atividade mutagênica, em tratamento contínuo, a CuP promoveu um maior efeito clastogênico, indicando que a cumarina isolada promove mais danos à célula vegetal do que quando associada a outros compostos presentes no extrato de guaco. No tratamento descontínuo do extrato, foi possível verificar que, tanto para 24h, 48h, quanto para o tratamento da Recuperação, houve uma queda do índice mitótico. No tratamento de 24h, a concentração de 0,001mg/mL apresentou efeito clastogênico, quando comparada ao controle negativo.

**Palavras-chave:** Prótons • Mutagenicidade • Alelopatia • *Allium cepa*.

## ABSTRACT

*Mikania glomerata* Spreng is a very studied species on the ethnopharmacological aspect and production of secondary compounds, such as coumarins. These compounds have been associated with the use of nanoparticles which are used to associate plant-active compounds, that are poorly soluble, increasing the bioavailability of these. Thus, the present study aims to evaluate the ionic capacity of the extract and nanodispersion of the content of coumarin (0.001; 0.002; 0.004; 0.008 and 0.016 mg/mL) of *Mikania*, relating this ability with a potential allelopathic and mutagenic activity in Roots of *Lactuca sativa* and *Allium Cepa*. The H + flow was determined in the root elongation zone using selective ion vibratory system. Allelopathic activity was evaluated by the germination test. After its protrusion, the roots were photographed and analyzed in ImageJ software. To evaluate the mutagenic activity, the seeds were germinated on Petri dishes in triplicate and received 5mL of *Mikania* extract in the same concentrations used for nanodispersion, in addition to the groups: pure Coumarin 0.002 mg/mL (CuP); Positive control methylmethosulfonate at  $4 \times 10^{-4}M$  (MMS)-as positive control-and negative control (distilled water). After root protrusion, slides were made for analysis of the mitotic index and possible chromosomal abnormalities. The data obtained were submitted to ANOVA and test of averages ( $p < 0.05$ ). The flow of H +, in the dose-response curve, indicated the concentration of 0.002 mg/mL, being the best concentration for comparison to the other treatments. It was also possible to observe that all treatments promoted inhibition of the H + flow when compared to the negative control. Similarly, it was found in the flow of coumarin content in nanodispersion, in which it was possible to evidence an oscillation, according to the concentrations analyzed. This result may be related to the inhibition of seed germination, abnormal cell differentiation and reduction of plant growth. In the analysis of allelopathic activity, it was observed that *Lactuca sativa* showed a higher decrease in the percentage of germination and a more expressive increase in the index of Allelpathy, when compared to *Allium Cepa*, at the concentration of 0, 004mg/mL of coumarin content in the extract. However, for the test with nanodispersion, it was evidenced that, in both testing organisms, there was a significant drop in germination and/or inhibition of germination, when compared to control, providing greater allelopathic activity. As for the mutagenic activity, in continuous treatment, the CuP promoted a greater clastogenic effect, indicating that the isolated coumarin promotes more damage to the plant cell than when associated with other compounds present in the Guaco extract. In the discontinuous treatment of the extract, it was possible to verify that, for 24h, 48h, and for the treatment of recovery, there was a decrease in the mitotic index. In the 24h treatment, the concentration of 0, 001mg/mL had a clastogenic effect when compared to the negative control.

**Keywords:** Protons • Cytotoxicity • Allelopathic • *Allium cepa*.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	24
2.2 Cumarinas.....	25
2.2.1 <i>Propriedades físico-químicas das Cumarinas</i> .....	27
2.3 <i>Formas extrativas e Nanodispersão</i> .....	28
2.4 <i>Nanoestruturas</i> .....	30
2.5 <i>Eletrofisiologia de plantas</i> .....	31
2.6 <i>Bomba de prótons em células vegetais</i> .....	33
2.7 <i>Alelopatia</i> .....	38
2.8 <i>Estudos citogenéticos em plantas</i> .....	41
2.8.1 <i>Allium cepa</i> – Organismo teste.....	42
2.8.2 <i>Lactuca sativa</i> – Organismo teste.....	43
3. OBJETIVO GERAL.....	45
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1 <i>Material Vegetal</i> .....	46
5.2 <i>Extrato Etanólico (EE) de Mikania glomerata</i> .....	46
5.3 <i>Obtenção da nanodispersão</i> .....	46
5.3.1 <i>Caracterização da nanodispersão</i> .....	47
5.3.2 <i>Cromatografia gasosa</i> .....	48
5.4 <i>Dosagem de cumarina do extrato e nanodispersão</i> .....	48
5.5 <i>Fluxo de íons prótons (H<sup>+</sup>)</i> .....	49
5.6 <i>Atividade alelopática</i> .....	53
5.7 <i>Atividade mutagênica – Ensaio Allium cepa</i> .....	54
5.7.1 <i>Tratamento contínuo e descontínuo</i> .....	54
5.7.2 <i>Preparo das lâminas citogenéticas</i> .....	55
5.7.3 <i>Análise das lâminas citogenéticas</i> .....	55
5.8 <i>Organismos teste vegetais</i> .....	57
5.9 <i>Estatística</i> .....	57
6. RESULTADOS.....	58
6.1 <i>Fluxo de Prótons</i> .....	58
6.2 <i>Atividade Alelopática</i> .....	67
6.3 <i>Atividade Mutagênica</i> .....	79

7. DISCUSSÃO DOS DADOS.....	87
8. CONCLUSÕES.....	98
9. REFERÊNCIAS.....	100

## 1. INTRODUÇÃO

A *Mikania glomerata* é uma espécie vegetal pertencente à família Asteraceae, conhecida vulgarmente como Guaco. É uma das espécies mais estudadas, quando se investiga o aspecto farmacognóstico, apesar de sua elucidação química não estar totalmente concluída (AMARAL et al., 2009). Assim, em virtude disso, existe uma necessidade de se pesquisar mais profundamente a via biossintética dos metabólitos secundários no gênero *Mikania*, para melhor entender os processos fisiológicos (fluxo de íons) celulares no meio em que vivem (MORA POLANCO, 2018).

As proporções de metabólitos secundários podem variar, de acordo com o efeito sazonal, o intra e interplanta, a idade e o desenvolvimento da planta, além de o desenvolvimento foliar, o surgimento de novos órgãos, os processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, assim como a temperatura, a altitude, o índice pluviométrico, a radiação UV, a poluição atmosférica, a herbivoria e os ataques de patógenos (CZELUSNIAK et al., 2012). Outro elemento o qual pode variar é o teor de cumarina no vegetal, uma vez que ocorre alteração da composição química, quando as plantas são submetidas a diferentes condições ambientais (BERTOLUCCI et al., 2013; DE LAZZARI ALMEIDA et al., 2017).

Nesse viés, os metabólitos secundários já foram considerados como produtos de excreção do vegetal no passado. Contudo, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente ligadas aos mecanismos que permitem a adaptação da planta ao meio, despertando grande interesse agrônomo pela sua atividade exercida no meio ambiente atualmente (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Assim, o uso desses metabólitos como biocidas podem causar impactos positivos, ou negativos. Em relação a esse último caso, tal fato de manifesta por meio de possíveis agentes tóxicos no ambiente e na saúde humana. Nesses contextos, os Bioensaios voltados à avaliação da capacidade alelopática e mutagênica são de suma importância, uma vez que podem ser empregados como forma de análise do potencial citotóxico, havendo detecção de possíveis alterações no índice de divisão celular e da presença de aberrações cromossômicas (PERON et al., 2009).



Já no que diz respeito ao lado positivo, o uso dessas substâncias, mais precisamente a cumarina, em forma de nanoestrutura, pode apresentar vantagens para a agricultura, uma vez que, com o tamanho reduzido, esses apresentam maior facilidade de alcançar o substrato desejado para ação (PEREIRA, 2008).

Além de abordar as características fisiológicas do Guaco, bem como os metabólitos secundários no gênero *Mikania*, é válido também enfatizar os mecanismos de transporte celular presentes em membranas biológicas. Esses podem ser classificados como primários e secundários. Os primários (bombas eletrogênicas) são responsáveis pelo gradiente eletroquímico gerado no transporte de íons contra o gradiente de concentração, utilizando compostos ricos em energia (ATP e PPi).

Já os secundários são constituídos por canais de proteínas e por seus carreadores de transportes, sendo capazes de transportar substratos através da membrana sem que haja quebra de ligações covalentes, dependendo do desequilíbrio de cargas, na membrana, gerado por sistemas primários (PRADO, 2017).

Em virtude disso, os objetivos deste estudo são a avaliação do fluxo de íons em raízes vegetais sob exposição de concentrações de cumarina do extrato de Guaco e relacionar com as atividades alelopáticas e mutagênicas determinadas pela não dispersão, ou pelo extrato de *Mikania glomerata* Spreng.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Mikania glomerata* Spreng.

O Brasil é o país com maior biodiversidade no mundo, possuindo cerca de 20% do número de espécies presentes em nosso planeta. Contudo, parte desta biodiversidade ainda não possui investigação das suas potencialidades terapêuticas (Ribeiro, 2014). Em geral, pesquisas com produtos naturais possuem um enfoque etnobotânico, com o uso medicinal das plantas pelo conhecimento da população de centros urbanos e rurais. No entanto, esse uso vem contribuindo para reconhecimento da capacidade terapêutica da flora brasileira (RODRIGUES; ANDRADE, 2014).

O gênero *Mikania* possui grande variabilidade morfológica entre suas espécies. Este gênero apresenta cerca de 450 espécies que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América, estando 198 delas presentes no Brasil, com distribuição que varia de norte a sul do país, sendo a *Mikania glomerata*, nativa do Brasil, amplamente encontrada nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (ROBINSON; SCHILLING; PANERO, 2009; RITTER et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017).

A *Mikania glomerata* Spreng. faz parte do grupo mais numeroso dentro das Angiospermas, a família Asteraceae, que compreende cerca de 1.100 gêneros com 25.000 espécies e é constituída por plantas pequenas, ervas ou arbustos e, raramente, árvores (VERDI et al., 2005).

Essa é um vegetal silvestre, de folhagem densa, perene, possui caule cilíndrico ramificado e glabro, sendo uma planta muito procurada por abelhas durante a época da floração, apresenta reprodução por sementes ou plantio de estacas do caule. O habitat dessa espécie são as margens de rios, mas também apresenta crescimento de forma espontânea em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, várzeas e possui boa adaptação ao cultivo doméstico (CZELUSNIAK et al., 2012).

Antigas civilizações já possuíam a percepção dos princípios ativos das plantas, usando o seu poder curativo contra diversas doenças (PIRES et al., 2014). Segundo

Messias e outros (2015), plantas com potencial medicinal, por definição, são aquelas que possuem substâncias com ação terapêutica e suas potencialidades são bem difundidas pelo mundo, sendo também amplo o uso destes vegetais pela população do Brasil.

Outra possível aplicação das plantas medicinais é o seu uso como herbicida, devido aos seus princípios ativos que podem atuar em diferentes sistemas biológicos, condição amplamente utilizada antes da introdução dos inseticidas sintéticos. Essa ação herbicida é possível, uma vez que os vegetais são capazes de liberar metabólitos secundários no meio ambiente, os quais podem ocasionar efeito alelopático podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos (MOREIRA, 2018).

## 2.2 Cumarinas

As cumarinas são metabólitos secundários pertencem a um grupo de compostos conhecidos como benzopirona, que consiste em um anel de benzeno unido a uma pirona (Figura 1).

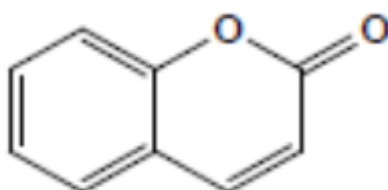


Figura 1: Ilustração do metabólico secundário cumarina, presente em *Mikania glomerata* (CZELUSNIAK et al., 2012, adaptado).

As cumarinas são substâncias encontradas livres, ou, como heterosídeos, em muitas famílias de dicotiledôneas e monocotiledôneas. Apesar de serem sintetizadas nas folhas, as cumarinas estão presentes em níveis mais elevados em frutas, raízes e caules (ASIF, 2015). A 1,2 benzopirona, uma cumarina simples, é uma das substâncias mais estudadas deste grupo, sendo muito utilizada como fragrância de perfumes e sabonetes e fornecer melhorias organolépticas em algumas bebidas alcóolicas (GASPARETTO, 2013). São derivadas de compostos fenólicos com potente ação alelopática e são bem conhecidas pela capacidade de interferir em

processos fisiológicos associados com a germinação de sementes, bem como crescimento e desenvolvimento de plantas (SALEH et al., 2015).

As cumarinas podem atuar nos mecanismos de defesa das plantas contra microrganismos, uma vez que são consideradas substâncias potencialmente tóxicas. No ambiente, este efeito é expresso de maneira dose dependente, condição que não é percebida da mesma forma, quando do uso de fitoterápicos disponíveis comercialmente, uma vez que nesses produtos os teores de cumarina não são padronizados (GASPARETTO, 2013).

As furanocumarinas distribuídas nessa planta podem interferir no seu crescimento por inibirem o metabolismo de hormônios vegetais e, conseqüentemente, afetar seus níveis endógenos e induzirem perturbações nas membranas celulares. Além disso, a excreção desses compostos no ambiente e sua possível ação em sementes de outros vegetais, pode determinar o atraso na germinação (ASIF, 2015; SALEH et al., 2015).

A variação sazonal e outras condições ambientais podem afetar os níveis de cumarina em várias partes da planta e a sua distribuição ativa, a capacidade desses compostos agirem, biologicamente, como fitoalexinas, condição que gera uma resposta a qualquer tipo de lesão, seja por murcha, injúria física, doença ou outros estresses. A partir da fixação e acúmulo deste composto na superfície de folhas, frutos e sementes, é que ocorrerá a inibição do crescimento e/ou esporulação dos patógenos fúngicos nas plantas, e, assim, as furanocumarinas atuarão também como repelentes de insetos e outros invertebrados (BOURGAUD et al., 2006; ASIF, 2015).

Algumas cumarinas podem ser reestruturadas para seus éteres butenílicos correspondentes, e essas reações ocorrem por intermédio de enzimas do complexo P450. Estes éteres butenílicos são instáveis e liberam porções de aldeído potencialmente tóxicos, o que contribui para o papel de fitoalexinas, que possuem como característica principal a capacidade de intercalar no DNA e criar ligações cruzadas covalentes, principalmente em resíduos de timina, bloqueando a replicação do DNA e transcrição e assim causando pequenos danos genômicos nos patógenos (BOURGAUD et al., 2006).

Na ação da alelopatia em plantas, as fitoalexinas fornecem novos substratos para o citocromo P450. No entanto, as furanocumarinas possuem a capacidade de inativar as enzimas monoxigenases, do complexo P450 fazendo ligações covalentes com a proteína, inibindo a biossíntese de giberelina e assim o crescimento do vegetal (BOURGAUD et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

### *2.2.1 Propriedades físico-químicas das Cumarinas*

A existência do conhecimento cinético da cumarina é de suma importância para avaliar a sua farmacocinética, principalmente, pela velocidade que a substância é absorvida, de acordo com algumas das características, como a solubilidade, o coeficiente de partição e a massa molar (LABAUNE, 1993).

Quadro 1: Caracterização físico-química e organolépticas da cumarina simples (1,2 benzopirona).

Nome	1,2 benzopirona, 2H-1-benzopirona-2-um, ácido cis-o-lactona cumarínico, anidrido cumarínico, e outros
Cor/Forma	Cristal branco ou quase branco (em linha). Também pode ser encontrada na forma de pó ou escamas.
Odor/Sabor	Odor perfumado semelhante ao de baunilha. Sabor amargo e aromático.
Fórmula Molecular	$C_9H_6O_2$
Estrutura Química	
Peso Molecular	146,15 g/mol
Ponto de fusão	68-70 °C
Coeficiente de partição (octanol:água)	Log $K_{o/w}$ : 1,39
Solubilidade	Solúvel em etanol e em solventes aquosos alcalinos, oxigenados e clorados. Muito solúvel em clorofórmio, éter etílico e óleos. Ligeiramente solúvel em água (1,9 mg/L a 20°C)

Fonte: (LAKE, 1999, apud GASPARETTO, 2013).

### 2.3 Formas extrativas e Nanodispersão

Para que haja desenvolvimento tecnológico de um extrato vegetal, são necessários estudos prévios: botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, atividade biológica e desenvolvimento de metodologias analíticas. Sendo assim, uma vez que se padroniza o método de extração na planta, ainda são necessários vários processos

de preparo e do seu fracionamento de forma mais seletiva e completa possível, utilizando líquidos apropriados e toxicologicamente seguros (MIYAKE, 2016).

A extração é uma operação físico-química de transferência de massa, em que sólidos solúveis e voláteis podem ser extraídos quando em contato com o solvente e extrato (VEGGI, 2006).

Os extratos brutos vegetais são misturas complexas que apresentam em sua composição diversas classes de produtos naturais com diferentes grupos funcionais. O processo de fracionar estes grupos bioativos corresponde a três fases principais: extração a partir da matéria vegetal, fracionamento do extrato ou óleo e purificação do princípio ativo (MIYAKE, 2016).

Para escolha de um método extrativo, é de suma importância avaliar a eficiência, estabilidade das substâncias extraídas, disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, a localização e a ligação com outros componentes, assim como as características químicas do solvente. A estrutura e composição diversas do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente demonstre um tipo de comportamento (PINELO et al., 2004, apud VEGGI, 2009).

#### **a) Extração a frio**

**Maceração:** Extração realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (processo estático). Não produz esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido, ou ao estabelecimento de um equilíbrio funcional entre o meio extrator e interior da célula.

- Digestão: consiste na maceração, realizada em sistema aquecido a 40 – 60°C;
- Maceração dinâmica: maceração feita sob agitação mecânica constante;
- Remaceração: quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator.

A escolha do solvente é crucial para o processo de extração sólido-líquido, uma vez que existe uma dificuldade de selecionar o solvente ideal, mas algumas características devem ser analisadas para que haja viabilidade no processo (MOGENSEN, 1982, apud VEGGI, 2006).

- Seletividade: habilidade do solvente para extrair o soluto do material em estudo;
- Viscosidade: alta viscosidade do solvente reduz a taxa de transferência de massa, influenciando o grau e a taxa da extração;
- Densidade: as densidades das duas fases devem ser diferentes para facilitar a separação delas;
- Volatilidade: solventes mais voláteis são mais fáceis de recuperar, diminuindo o custo do processo;
- Ponto de ebulição: fator limitante para a temperatura do processo de extração. (Deve-se trabalhar com temperaturas abaixo do ponto de ebulição, para evitar perda de solvente);
- Inflamabilidade: importante no que diz respeito a segurança;
- Toxidez: aspecto extremamente importante e pode ser considerado sob três níveis: risco para o operador, risco quando liberado ao meio ambiente;
- Custo: analisado para estimular o custo de operação, porém deve ser feito baseado na efetividade do solvente.

#### *2.4 Nanoestruturas*

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar com grande prospecção, sendo adotada por vários setores, tais como: indústria farmacêutica, de eletrônicos e energia. Recentemente a agricultura abriu as portas para a nanotecnologia, pelo aumento da reatividade química, solubilidade e propriedades magnéticas e ópticas únicas (KANJANA, 2015).

O uso de nanopartículas, com o decorrer das décadas, vem obtendo uma crescente atenção devido à sua ampla aplicação, desde utilização para fins terapêuticos, quando associadas a ativos pouco solúveis, até a proteção de ativos, aumentando sua capacidade de biodisponibilidade. Essas partículas funcionam também como biomarcadores (FORNAGUERA et al., 2016).



As nanoemulsões apresentam um sistema cinético estável, uma vez que o arranjo da carga elétrica na superfície da gotícula de óleo (tensoativo) é, geralmente, modulado como uma dupla camada elétrica, íons na camada interna estão fortemente ligados à superfície da gota, uma vez que íons na camada exterior –de carga oposta - são menos firmemente associados entre si. Obtendo o equilíbrio entre a força de Van der Waals, atração, e repulsão elétrica da dupla camada determinada pela estabilidade da nanoemulsão (de óleo e água) (ORELLANA et al., 2015). Devido ao tamanho das nanoestruturas, que possuem de 20 a 200 nm de diâmetro, elas podem se fundir seletivamente com membrana celular das plantas (JOE et al., 2015).

A biodisponibilidade de alguns fármacos e compostos só é permitida por meio de compostos altamente lipofílicos. Bem com o uso de nanoemulsões. Assim, as cumarinas, que são lipofílicas, podem estar associadas ao núcleo do óleo (PANATIERI et al., 2016). A nanodispersão é termodinamicamente estável, transparente, possui baixa viscosidade e dispersão isotrópica, constituída de óleo e água além de moléculas surfactantes e cotensoativos. Em conjunto, possuem a capacidade de estabelecer um sistema de distribuição de substâncias intracelular, podendo apresentar toxicidade ao biodisponibilizar substâncias (SINGH et al., 2015).

### *2.5 Eletrofisiologia de plantas*

A descoberta da propagação de sinais elétricos e sua interação com as plantas foi realizada pelo pesquisador biofísico indiano Jagadis Chandra Bose, que publicou pesquisas inovadoras, entre 1885 e 1900, totalizando dez artigos na *Proceeding of the Royal Society*, *Philosophical Magazine* e *The Electrician*. Bose também inventou o primeiro semi-condutor com tecnologia de micro-ondas (SHEPHERD, 2012).

Chandra Bose inferiu, por meio da análise de seus resultados, que as plantas possuem um aprimorado sistema de comunicação, o qual considerou como um sistema nervoso central bem definido. Nesse sentido, tais plantas possuem movimentos que interagem com o meio ambiente via propagação de sinais elétricos. Assim, todas elas produzem um pulso eletromecânico e são capazes de se comportarem de forma inteligente, com a presença de memória e aprendizado. Contudo, as plantas possuem receptores de estímulo, condutores que organizam a

propagação desses estímulos e efeitos para os demais órgãos da planta (SHEPHERD, 2012).

Com a técnica da microsonda vibrátil seletiva a íons, é possível estudar determinadas oscilações de um determinado íon, sem que haja dano no material de estudo. Bluh e Scott, em meados do século XX, realizaram a primeira aplicação biológica dessa técnica, que posteriormente foi usada em determinação de fluxo iônico em músculos esqueléticos (DAVIES, 1966). Com o aperfeiçoamento da microsonda vibrátil houve uma melhoria na sensibilidade do método, possibilitando a medida das correntes extracelulares de baixa magnitude, na superfície de uma membrana biológica (RAMOS, 2005).

O interior da célula vegetal é separado do ambiente por uma parede constituída de membrana plasmática e por duas camadas de moléculas de lipídeos (Figura 6). Além de separar o meio interno do meio externo, a membrana plasmática também funciona como uma barreira hidrofóbica, facilitando a regulação constante de passagem de íons e moléculas à medida que a célula absorve nutrientes (COLODETE, 2013), fato que pode ser observado na Figura 2:

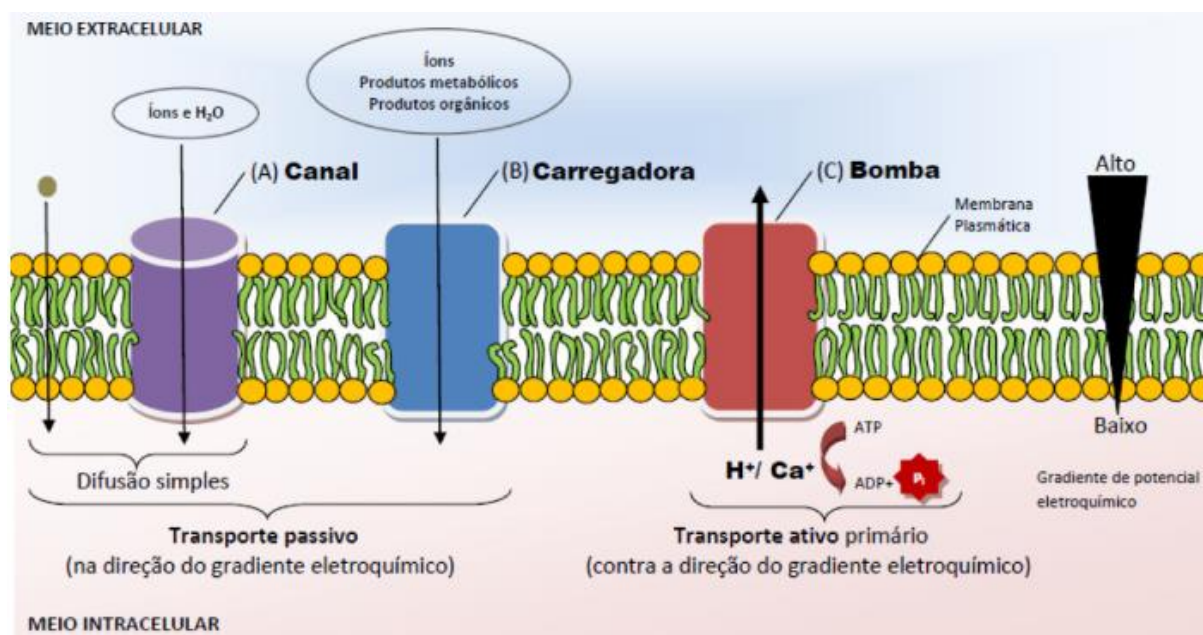


Figura 2: Três classes de proteínas transportadoras de membrana: (A) canais, (B) carregadoras e (C) bombas. Proteínas canais e carregadoras podem mediar o transporte passivo de soluto pela membrana (por difusão simples ou difusão facilitada) a favor do gradiente de soluto e potencial eletroquímico. (A) Proteínas canais agem como poros nas membranas e sua especificidade é determinada primeiramente

pelas propriedades biofísicas no canal. (B) Proteínas carreadoras se ligam na molécula a ser transportada em um lado da membrana e depois a liberam do outro lado. (C) O transporte ativo primário é realizado pelas bombas e usam energia diretamente, usualmente da hidrólise do ATP, para bombear os solutos contra o seu gradiente ou potencial eletroquímico (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Nesse contexto, uma limitação da técnica, a microsonda vibrátil seletiva de íons, é a análise do comportamento de um íon e sua implicância nas correntes. Para isso, são feitos ensaios de substituição com uso de inibidores específicos da atividade de canais de bombas, para que possa haver a determinação da contribuição individual de cada íon. Com o melhoramento da técnica, são utilizados ionóforos específicos na ponta das micropipetas, ao invés de eletrodos metálicos, sendo então denominada de *ion-selective vibrating probe* (microsonda vibrátil seletiva a íon) (RAMOS, 2005).

### *2.6 Bomba de prótons em células vegetais*

As bombas de prótons são proteínas de membrana, que realizam transporte de íons como  $H^+$ , ou  $Ca^{2+}$ , e funcionam a partir da hidrólise de moléculas de ATP, ocasionando um gradiente ao transportar íons contra o gradiente de concentração, efetuando um transporte ativo dos prótons na membrana da célula, fazendo-se o uso de compostos ricos em energia e objetivo manter a composição iônica intracelular (importação de solutos, balanço da pressão osmótica de ambos os lados da membrana e manutenção do potencial da membrana celular) (BERTOLAZI, 2013; CATUNDA, 2008).

As membranas foram intituladas como componente central de oscilação celular, e a atividade de transporte de membrana são presentes em todas as plantas. Exemplo destas oscilações são as mudanças rítmicas na superfície e potencial de membrana plasmática, oscilações potenciais e vacuolares, variação da concentração do apoplasto, oscilação citosólica e  $Ca^{2+}$ , e fluxo de íons nestas oscilações através da membrana plasmática de uma variedade de tipos de células (SHABALA et al., 2006). Estas oscilações celulares são amortecidas, fazendo com que não seja facilmente observada. Uma forte associação foi encontrada entre fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  e a taxa de crescimento da raiz (SHABALA et al., 1997; SHABALA; NEWMAN, 1997)

A  $H^+$ -ATPase, presente na membrana plasmática das plantas, possui a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo pelo gradiente de pH e

potencial elétrico, utilizando o ATP como substrato, para bombear prótons pela membrana plástica até o apoplasto, sendo, assim, constituída por uma cadeia polipeptídica de 100kDa, aproximadamente, podendo dar formação a dímeros. Estas H<sup>+</sup>-ATPases formam um gradiente de pH e um potencial elétrico através da membrana, exercendo funções de acidificação da parede celular, plasticidade e expansão celular (AZEVEDO, 2006; SZE; LI; PALMGREN, 1999).

Para que haja absorção, é necessário um transporte secundário de H<sup>+</sup>, no qual os solutos são transportados via membrana a favor de um gradiente eletroquímico, vinculado a uma combinação do H<sup>+</sup> com íon. Este último é denominado de transporte secundário de H<sup>+</sup>, onde a energia necessária é decorrente da força próton-motriz, proveniente do ATP, realizada pelas H<sup>+</sup>-ATPases (MORSOMME; BOUTRY, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em plantas e fungos, a capacidade energética na membrana plasmática é gerada por uma força promotora de ATPases tipo P especializada em transporte de prótons. Em muitos estudos, tem sido demonstrado que a proteína 100-kDa é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta. Existem tecnologias que proporcionam uma forma de quantificar as alterações da fosforilação H<sup>+</sup>-ATPase em diferentes sítios, podendo ser seguida de testes químicos, ou genéticos em plantas. Essas técnicas são importantes para medição da auxina – reguladora do crescimento (HARUTA et al., 2015). Trabalhos realizados com leveduras e plantas superiores indicam que a fosforilação está envolvida na regulação da atividade da bomba, sendo essencial em muitos processos, incluindo transporte de soluto e controle do alongamento celular (NGUYEN et al. (2015)

O canal de proteínas é constituído por uma família de transportadores transmembranares que possuem a função de permutadores de íons de H<sup>+</sup>. A parede celular, das plantas, é constituída por microfibrilas de celulose, embebidas em uma matriz reticulada de polissacarídeos (pectinas e glicanos), e proteínas estruturais. A teoria do crescimento ácido das plantas menciona que o próton é o fator de afrouxamento da parede celular, fazendo com que a célula suporte a clivagem de ligações. Assim, o turgor fará com que uma célula com a parede “afrouxada” possa expandir (MORADI et al., 2015). Uma enzima é um excelente exemplo de proteína transmembrana, cuja atividade é influenciada por compartimentos hidrófilos em

ambos os lados da membrana e pelos domínios hidrofóbicos da bicamada lipídica (MORALES-CEDILLO et al., 2015).

As bombas de  $H^+$  funcionam com transporte ativo primário de translocação de prótons do lado de fora de cada célula, havendo fornecimento elétrico e energia química que impulsiona o transporte do soluto. Em plantas, a enzima também fornece um ambiente ácido na parede celular, favorecendo a expansão das células (Figura 3) (HARUTA et al., 2015), além de desempenhar papel importante nas funções fisiológicas, como absorção de nutrientes, regulação de pH intracelular, abertura estomática, crescimento celular, bem como fornece a capacidade de adaptação contra estresse salino, desidratação, baixa temperatura, metais pesados, leves e deficiência de nutrientes (LIANG et al., 2015).

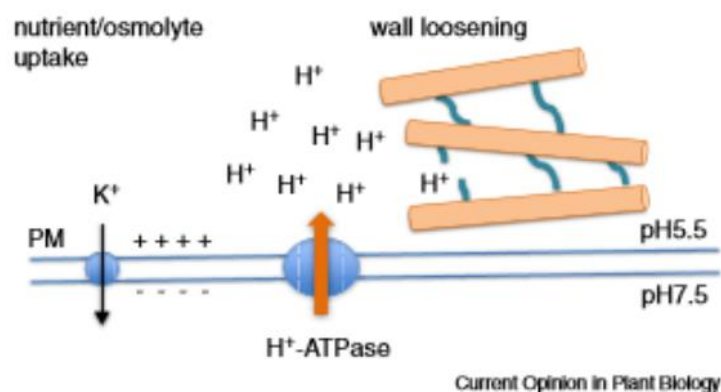


Figura 3: Energia na membrana plasmática produzida por  $H^+$ -ATPase. Iniciando o gradiente eletroquímico (prótons) através da membrana plasmática (HARUTA et al., 2015).

A homeostase intracelular de  $H^+$  é essencial para muitos processos metabólicos e enzimáticos. Bombas de  $H^+$ , tais como  $P$ -ATPase,  $V$ -ATPase, e HPPase, têm a capacidade de mediar e estabelecer gradientes de prótons, além de contribuir para a regulação do pH citosólico (HAN et al., 2015).

$H^+$ -ATPase de membrana plasmática é uma bomba eletrogênica que exporta prótons celulares, o que gera um gradiente transmembrana químico, e estabelece um gradiente elétrico (Figura 4). A grande maioria das proteínas de transporte da membrana plasmática são energizadas por esta combinação de gradiente eletroquímico de prótons, gerando grandes questionamentos da fisiologia do vegetal onde a  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática e proporciona grande potência para o crescimento da planta (FALHOF et al., 2016).

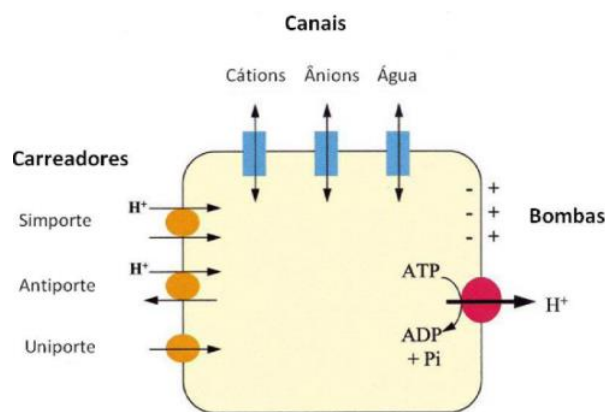


Figura 4: Esquema demonstrando transporte primário e secundário através de membranas biológicas de células vegetais (MORSOMME; BOUTRY, 2000, adaptado).

Por mais que a bioquímica da bomba seja conhecida com detalhes, as evidências do seu papel no crescimento de vegetais ainda permanecem escassas. Além de evidências fisiológicas para que haja noção de que a H<sup>+</sup>\_ATPase funciona como um motor do crescimento, foram baseadas utilizando inibidores da bomba, sendo nenhum específico para membrana plasmática, tais como vanadato, e na expressão elevada de H<sup>+</sup>\_ATPase em células especializadas no transporte de solutos, tais como as células-guarda dos estômatos, floema, parênquima, e transferência de células. Além disso, a correlação entre a quantidade de proteína e suas funções específicas apenas ligam os mecanismos, não provando a expressão gênica para o papel fisiológico, uma vez que os níveis de expressão são constantes, respondendo a uma variedade de estímulos ambientais e cada planta possui múltiplos genes e cada célula pode expressar de forma diferente (FALHOF et al., 2016).

A translocação de prótons pirofosfatásica em plantas é, geralmente, considerada uma atividade de prótons localizada no tonoplasto que utiliza energia liberada, via hidrólise do fosfoanidro, para auxiliar na acidificação do vacúolo. Sugere-se que a função da H<sup>+</sup>PPase seja acidificar adicional para V\_ATPase complementar, em especial nos tecidos jovens, em crescimento, na qual a pirofosfatase é abundante e o ATP é empobrecido (GAXIOLA et al., 2016).

As ATPase do tipo P são divididas em grupos, baseando-se na seleção de íons que transportam. Estas são envolvidas no transporte de metais pesados como Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup>, estas enzimas transportam vários cátions sendo reguladas pela concentração do substrato (ATP), pH e temperatura. Elas podem ser

ativadas/desativadas pelos hormônios, resposta à luz, ataque de patógenos etc. Esse mecanismo é auto-inibitório na região C-terminal da cadeia polipeptídica agindo como um mecanismo regulatório da atividade de bomba de prótons (Figura 4) (AZEVEDO, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A  $H^+$ -PPase tem papel importante para o metabolismo energético, na qual o pirofosfato (PPi) é um sub-produto natural decorrente de inúmeras biossínteses. O PPi é hidrolisado pelas PPases, o que favorece as polimerizações biossintéticas ao promover a diminuição da concentração citoplasmática deste material. Existem inúmeras PPases associadas à membrana de bactérias fotossintéticas, à membrana interna mitocondrial, e à membrana vacuolar (tonoplasto). Esta última é uma enzima transportadora de prótons, composta por um polipeptídeo de 73 kDa e possui aproximadamente 770 resíduos de aminoácidos. Ela não possui inibidores específicos, mas é muito sensível a altas concentrações de vanadato e fluoreto, e a baixas concentrações de pirofosfato inorgânico (AZEVEDO, 2006).

A fração microssomal é constituída por vesículas de membranas provenientes da plasmalema e do tonoplasto, em que as enzimas principais responsáveis pela catálise da hidrólise de ATP é a  $H^+$ -ATPase. Na membrana microssomal, é possível observar a hidrólise do pirofosfato (PPi), que é catalisada pela pirofosfatase translocadora de prótons ( $H^+$ -PPase). Em vegetais, as condições fisiológicas e estresse, podem fazer com que o pirofosfato assumo o papel de ATP, sendo um doador de energia. A  $H^+$ -PPase é funcional na energização dos transportes secundários da membrana vacuolar (RAMOS; ANTÔNIO, 2005).

O aparato bioquímico do vegetal possui finalidade de promover a desintoxicação intracelular, uma vez que as moléculas dos compostos químicos são translocadas para o interior do citoplasma, via transporte de membrana. Esse processo é dependente de um gradiente eletroquímico gerado por transportadores primários de prótons ( $H^+$ ) (OGLIARI et al., 2009).

A despolarização é uma sinalização que se espalha pela membrana em velocidade alta. Sendo evidente o uso de sinais elétricos, em plantas, para coordenar essa atividade de sinalização, que regulam uma variedade de funções fisiológicas para que haja melhoramento nas respostas adaptativas de plantas. Tal propagação

elétrica resulta em assimilação de CO<sub>2</sub> e rendimento no PSII, respiração, consumo de água, trocas gasosas, abertura estomática, absorção de nutrientes, carregamento do floema e expressão gênica (SHABALA et al., 2015).

### 2.7 Alelopatia

Algumas plantas podem ter efeitos deletérios sobre a agricultura, devido ao fato de competir por espaço, luz e nutrientes dentro da comunidade ecológica. Subprodutos químicos, liberados pelas plantas, são lixiviados e podem provocar modificações no ambiente e acarretar em interações entre as plantas fenômeno este conhecido como alelopatia. Assim, estas substâncias são possivelmente a principal causa de efeitos fitotóxicos em plantas nativas ou não adaptadas (MENSAH et al., 2015; SAHID et al., 2015; HOSSAIN et al., 2016). Contudo, muitos fatores influenciam no acúmulo destes subprodutos no solo, como a textura do solo, característica química e comunidade microbiana (LI et al., 2015).

Durante a evolução, as plantas desenvolveram vias biossintéticas que sintetizam e acumulam uma grande variedade de metabólitos secundários, podendo a rota responder às características do ambiente em que essas ocorrem. Participando ativamente na interação entre os vegetais, assim, o meio biótico pode servir como atrativo aos polinizadores, ou dispersores (ANESE et al., 2015). Nesse contexto, os metabólitos apresentam papel importante na interação entre as comunidades bióticas (NEGI et al., 2016). Esses são usados também como defesa, ou como aleloquímico contra outros vegetais, de forma direta ou indireta, além de proporcionarem efeito benéfico de ciclagem de nutrientes e melhoria do solo (HALIMSHAH et al., 2016; HOSSAIN et al., 2016).

Os produtos aleloquímicos são encontrados em toda a planta, sendo que, em uma única espécie, a quantidade destes produtos pode variar entre as partes da planta, fato observado em trabalhos com *Mikania micranta*. Estes compostos podem ser considerados fitotóxicos, dependendo da ação alelopática (ANESE et al., 2015)

A concentração de bioativos, persistência e forma em que são liberados no ambiente pode influenciar de forma indireta no desenvolvimento da planta, por meio de transformações dessas substâncias no solo, ou pela atividade de microrganismos,



pela ação direta ocasionando inibição e alteração de processos de crescimento e de desenvolvimento da planta por meio de modificações no processo de fotossíntese, respiração, transpiração, funcionamento das membranas, absorção de nutrientes e síntese de ácidos nucléicos (RAMOS, 2017).

A sementes, quando expostas a aleloquímicos, provocando a inibição de sua germinação, apresentam uma evidência negativa da alelopatia, possibilitando a evidência de possíveis danos, como a inibição do crescimento, desenvolvimento ou metabolismo vegetal (MENSAH et al., 2015). Efeitos mais comuns, da alelopatia negativa, são a atrofia, a redução do crescimento radicular, a ausência da raiz primária ou secundária e a redução do crescimento do hipocótilo (ANESE et al., 2015).

Trabalho executado por Meinerzet e outros (2015), usando extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng., em germinação e desenvolvimento de plântulas de alface e tomate, evidenciou que o extrato utilizado proporcionou uma diminuição da porcentagem de germinação de sementes de alface e tomate em relação ao controle, havendo redução de 100% da germinação das sementes, para extrato aquoso bruto de 15%, e suas frações de 15% e 10%.

Os compostos do metabolismo secundário participam como sinalizadores em processos de degradação celular, desencadeando a produção e o acúmulo de formas reativas de oxigênio, influenciando assim a permeabilidade e seletividade das membranas celulares havendo redução da velocidade e porcentagem da germinação, nível hormonal e aparato fotossintético (AUMONDE et al., 2015).

Alguns extratos vegetais, ou aleloquímicos, têm apresentado uma ampla utilização contra pragas e têm sido apontados como uma alternativa aos pesticidas, pois apresentam pouca ameaça para o ambiente ou para a saúde humana, havendo degradação rápida no ambiente (ANESE et al., 2015).

O uso excessivo de agrotóxicos químicos na agricultura leva à contaminação de fontes superficiais e subterrâneas de águas, além da saúde pública, assim as pesquisas visam identificar métodos agrícolas sustentáveis, podendo ser conseguido por aplicação do conceito da alelopatia nas atividades agrícolas, por meio do conhecimento do mecanismo e ação de várias substâncias provenientes do

metabolismo secundário (DEBASTIANI, 2015; SAHID et al., 2015; HALIMSHAH et al., 2016).

O favorecimento, ou inibição da germinação e demais eventos fisiológicos, são decorrentes da ação de aleloquímicos oriundos do metabolismo secundário vegetal, tais como os esteroides, fenóis, terpenos, alcaloides, taninos, cumarinas e flavonoides (AUMONDE et al., 2015). Com isso, em estudos recentes com *Potentilla acaulis*, verificou-se a magnitude do efeito alelopático, em plantas nativas, estando diretamente relacionada à concentração de lixiviados e diferenças em receptores, nos quais os efeitos negativos aumentaram diante da elevação da concentração de exsudado, ainda que as plantas apresentaram uma variação de crescimento, entre as espécies, sugerindo que a alelopatia pode explicar a relação de dominância entre comunidades vegetais e áreas degradadas (ZHANG et al., 2015).

Diante disso, estudos sobre alelopatia podem auxiliar no controle de plantas daninhas em convivência com culturas de interesse, uma vez que, atualmente, existe o controle dessas plantas daninhas por meio químico, ou por uso intensivo de dessecantes e/ou por seleção de biótipos resistentes. Assim, o manejo alternativo possui a finalidade não só de substituir, mas também de reduzir o uso habitual, ou excessivo de herbicidas em ambiente de cultivo, sendo, assim, uma alternativa eficiente e ecológica sustentável (BARBOSA, 2018).

Os metabólitos envolvidos em interações alelopáticas podem ser uma importante fonte de estruturas químicas novas para produção de moléculas que poderão ser utilizadas em indústrias agroquímicas. Entre estes compostos, estão os monoterpenos voláteis, sesquiterpenos lactonas, benzoxanonas e sorgoleona podem apresentar potencial herbicida. Sendo os monoterpenos, os mais explorados em estudos com manejos de plantas daninhas, por ocasionarem redução da atividade mitótica e formação de glóbulos lipídicos nas plantas, apresentando capacidade fitotóxica em diversas espécies de plantas como milho, trigo, soja, alface e pepino (ANESE et al., 2015; MOREIRA, 2018).

## 2.8 Estudos citogenéticos em plantas

Os estudos citogenéticos analisam os cromossomos, de acordo com o número, configurações e comportamento, com o objetivo analisar seu pareamento e segregação (VALLS, 2014), Efeitos provenientes da genotoxicidade e mutagenicidade podem ser avaliados por meio do processo de inibição celular (SANTOS et al., 2017). A citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade envolvem o estudo de substâncias que podem causar possíveis alterações dentro do processo de divisão celular e, conseqüentemente, ocasionar mutações cromossômicas por sua capacidade tóxica (FREITAS, 2014).

Estes estudos que visam a bioensaios com plantas para biomonitoramento da genotoxicidade foram iniciados com o *International Program Chemical Safety* (IPCS), o *United Nations Environmental Program* (UNEP) e o *World Health Organization* (WHO). Em relação a ensaios citogenéticos, a capacidade de bioacumulação, em plantas, pode indicar a presença de substâncias tóxicas no meio ambiente mesmo em concentrações baixas, estando as raízes em contato direto com o meio, atuam como uma barreira contra translocação, o que justifica a intensidade de danos no seu material genético em suas células (DUARTE, 2014; SANTOS; RODRIGUEZ, 2011).

Os bioensaios têm por finalidade a medição da resposta de organismos a alguma exposição, em diferentes concentrações, ou quando se quer determinar níveis de qualidade de qualquer recurso ambiental, realizados em laboratórios sob condições específicas. Estes estudos são baseados em parâmetros com a finalidade de verificar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias testadas, tal como a influência na taxa de germinação, índice de velocidade de germinação, alongamento de raiz, biomassa fresca, biomassa seca, tempo médio de germinação, alongamento de parte aérea, crescimento do hipocótilo, número de sementes germinadas e não germinadas, além de aspectos micromorfológicos de plântulas (ROSA et al., 2017; MOREIRA, 2018).

O efeito genotóxico é conhecido como uma ação nociva que afeta a integridade celular do material genético uma vez que, os agentes genotóxicos interagem com os ácidos desoxirribonucleico (DNA), proporcionando modificações em sua estrutura e função. Desta maneira, estas modificações se fixam ao ponto de serem transferidas e ocasionarem mutações, que são consideradas fonte para que haja variabilidade

genética de um grupo, e essencial para manutenção das espécies (VERRI et al., 2018).

Mutação por definição é qualquer modificação no conjunto gênico de um organismo que não pode ser justificada por uma recombinação da variabilidade genética já existente. Nas modificações gênicas estão presentes mudanças no número de cromossomos (euploidia, poliploidia e aneuploidia), mudanças na estrutura cromossômica (aberrações cromossômicas) e alterações nos genes individuais (PORTIS et al., 2016).

### 2.8.1 *Allium cepa* – Organismo Teste

O teste de toxicidade genética é muito utilizado para determinar a capacidade citotóxica de substâncias e medicamentos, para avaliação de possíveis alterações cromossômicas encontram-se a avaliação de aberrações cromossômicas, que possibilita identificação de alterações em estrutura metafásica (GUIDOTI et al., 2013).

O *Allium cepa* é um ótimo bioindicador para o primeiro *screening* da citogenotoxicidade de infusões de plantas medicinais, pela sua sensibilidade e exatidão, havendo crescente uso do teste *Allium cepa*, pela comunidade científica, uma vez que é um item universal, sempre disponível, cultivável em qualquer época do ano, possui desenvolvimento rápido, as raízes são macias e com meristema abundante, suas células e cromossomos são grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), o que permite a observação por microscópio óptico. Além do processo de divisão celular que é semelhante ao processo de divisão celular humano (LESSA et al., 2017).

Por meio de contagem de aberrações cromossômicas é oferecida uma medida direta avaliativa da atividade clastogênica, o tipo de aberrações encontradas depende do agente genotóxico, fase do ciclo celular e tempo de tratamento (DARROUD, 1990; GUIDOTI et al., 2013)

A avaliação de mecanismos de ação de possíveis agentes mutágenos é de grande importância para o entendimento e compreensão de como as células alcançam a modulagem ao longo do processo toxicológico, podendo haver aumento ou diminuição de danos genéticos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

### 2.8.2 *Lactuca sativa* – Organismo teste

A espécie *L. sativa* (alface) apresenta maior sensibilidade à efeitos de aleloquímicos e por ser resistente a uma ampla faixa de pH, sendo, assim, considerada como indicadora de alelopatia e muito utilizada para testes de laboratório (UHLMANN et al., 2018).

A *Lactuca sativa* é uma espécie de baixo custo e apresenta peculiaridades em sua utilização, como: germinação rápida, crescimento linear em ampla variação de pH, baixa sensibilidade a potenciais osmóticos de extratos, pequeno número de cromossomos e presença de cromossomos grandes, sendo essas duas últimas de grande avalia para estudos citogenéticos. Além disso, a alface pode ser facilmente encontrada no comércio ao longo do ano e possuir baixo custo (MOREIRA, 2009).

Para ensaios de potencial alelopático, é primordial avaliação de germinação e de crescimento em relação às espécies que apresentam germinação rápida e uniforme, apresentando grau de sensibilidade que permita expressar resultados mesmo em baixas concentrações de substâncias (SOUTO et al., 2015).

Portanto, o presente estudo se justifica pelo ineditismo das análises comparativas entre extrato e nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng. e, também, pela abordagem de vários aspectos dos compostos secundários desta espécie, que já consta como uma das mais importantes da família Asteraceae quando consideradas as suas ações biológicas.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade iônica do extrato e da nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng., correlacionando com as possíveis atividades alelopática e mutagênica em dois sistemas testes (*Lactuca sativa* e *Allium cepa*).

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o fluxo de íons prótons ( $H^+$ ) em raízes de *Allium cepa* produzidas a partir de sementes germinadas sob exposição contínua e descontínua ao extrato ou à nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng.;
- Avaliar a atividade alelopática em raízes de *Allium cepa* e *Lactuca sativa* submetidas ao extrato e à nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng.;
- Avaliar a atividade mutagênica do extrato e da nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng., em raízes de *Allium cepa*, em tratamento de contínuo e descontínuo;
- Relacionar os resultados dos experimentos conduzidos com o extrato de *Mikania glomerata* Spreng. com aqueles alcançados com a utilização da nanodispersão.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Material Vegetal

Todos os protocolos do presente estudo foram realizados com extrato etanólico de *Mikania glomerata* Spreng de plantas coletadas na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural – INCAPER, localizada no Município de Viana/ES. O material vegetal obtido foi seco em estufa de circulação de ar à 40°C e, posteriormente, pulverizado utilizando moedor elétrico. A exsicata do material vegetal foi confeccionada e registrada sob o número 37997 no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.

### 5.2 Extrato Etanólico (EE) de *Mikania glomerata*

O material vegetal foi pulverizado e submetido à maceração em etanol:água (70:30 v/v), a temperatura ambiente (25 a 30°C) sob abrigo de luz durante 72 horas. Posteriormente foi filtrado e o solvente evaporado utilizando rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida a 60°C. Após a extração do solvente o extrato permaneceu em estufa a 60°C até secar por completo, o extrato foi mantido em local refrigerado até o momento da realização dos experimentos.

### 5.3 Obtenção da nanodispersão

Para a obtenção da nanodispersão, foi por meio de produção e análise de sua estabilidade e caracterização para o presente estudo, o Prod. Dr. Caio Pinho Fernandes, do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, da Universidade Federal do Amapá em colaboração com prof. Dr. Hildegardo Seibert França do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, *Campus Vila Velha*, realizou gentilmente as análises para da nanodispersão.

Durante a formulação da nanodispersão, foram obtidas variações de concentrações de água e dos tensoativos monooleato de polietilenoglicol 400 (MP 400) e dioleato de polietilenoglicol 400 (DP400) em proporções fixadas (Tabela 1) (SANTANA, 2015). Esses tensoativos são utilizados para formação de partículas com tamanho inferior a 200 nm, atuando como plastificantes e facilitando a estabilização

do sistema, pois, no caso dessa nanodispersão, quanto menor o diâmetro da gotícula maior a sua estabilidade (SOLANS et al., 2005).

A dispersão aquosa de tensoativos foi preparada por agitação magnética (500rpm) da mistura de MP400/DP400 em água, por 10 minutos. Posteriormente, foi extraída a cumarina do vegetal com a dispersão aquosa de tensoativos (1:100) sob agitação magnética (500rpm) por 24 horas. Após, a agitação magnética, foi feita a filtração por gravidade utilizando papel filtro, para remoção do material vegetal e obtenção das nanodispersões à base de *Mikania glomerata*. Todas as formulações foram acondicionadas em temperatura ambiente e as análises realizadas em triplicata.

Tabela 1: Proporção relativa dos constituintes das diferentes dispersões aquosas de tensoativos empregadas na preparação das nanodispersões de *Mikania glomerata*

Formulação	Água	MP400	DP400
1	90,00	5,00	5,00
2	91,25	3,75	5,00
3	91,25	5,00	3,75
4	92,50	3,75	3,75
5	92,50	2,50	5,00
6	92,50	5,00	2,50
7	93,75	2,50	3,75
8	93,75	3,75	2,50
9	95,00	2,50	2,50

Fonte: da autora.

### 5.3.1 Caracterização da nanodispersão

A caracterização da nanodispersão baseada no tamanho e carga da superfície é altamente importante para o desenvolvimento e aplicação das formulações. As dimensões da nanopartícula são influenciadas pelo tamanho, pela natureza das partículas que a compõem, pela concentração das amostras, pela propriedade da solução e pelos princípios fundamentais dos métodos aplicados (DOMINGOS et al., 2009; SANTANA, 2015).

Para caracterização da nanodispersão, foram aplicados os métodos: Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), que tem o objetivo de fazer medição do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão (Pdi) das partículas e o Potencial



Zeta, que é utilizado para determinação da carga superficial as partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em virtude da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou por meio da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão, sendo o valor  $>\pm 20\text{mV}$  é um indicativo de boa estabilidade físico-química da formulação e assim, o tamanho da partícula dos sistemas coloidais ajuda a reduzir a força gravitacional e a sedimentação enquanto evita a floculação (SCHAFFAZICK et al., 2003; GALINDO-PÉREZ et al., 2015).

Nanodispersões à base de *Mikania glomerata* foram analisadas utilizando equipamento Zetasizer 5000 (Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água purificada (1:25) e as medidas feitas em triplicata, sendo todos os resultados expressos em função da média e desvio padrão (COSTA et al., 2014).

### 5.3.2 Cromatografia gasosa

Para a identificação do teor de cumarina nas amostras de nanodispersão, foi realizada a análise de cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM), estas análises foram efetuadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS – QP5050Q, equipado com injetor *isplit/splitless*, operando em modo *splitless*. Para esta análise foi utilizada uma coluna DB-5MS, fazendo necessário uso de nitrogênio como gás arraste. A temperatura do forno variou de 80°C até 200°C com taxa de aquecimento de 12°C/min.

### 5.4 Dosagem de cumarina do extrato e nanodispersão

Os teores de cumarina foram quantificados segundo descrição da Farmacopéia Brasileira 4ª edição, parte 2, fascículo 6, com modificações (BRASIL, 2005). Para a produção de extrato etanólico, foram pesados 10,5 mg e diluído em 1mL de Metanol (MeOH), posteriormente realizada a centrifugação e filtração em membrana de celulose de 0,45µm. Para a obtenção de nanodispersão foi realizada extração com diclorometano, sendo adicionados 2mL da nanodispersão em um balão separado e adicionados 5mL de diclorometano. Após agitação e separação de duas fases, a fase

contendo diclorometano foi reservada, sendo, então, adicionados 5mL de diclorometano e o procedimento repetido.

Após a extração, o diclorometano foi evaporado, em temperatura ambiente e em capela de exaustão, e a cumarina diluída em 2mL de metanol. Foram utilizados 20µL de cada formulação para a injeção em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em Sistema Waters Breeze equipado com bomba Waters 1525 binary HPLC e sistema de detecção UC/VIS Waters 2489. Assim, também foi utilizado a coluna Supelco Nucleosil® C18 (250 x 3,5 mm. 5µm), fluxo de 0,5mL.min<sup>-1</sup>, detecção UV<sub>275nm</sub> e eluição isocrática (H<sub>2</sub>O-MeOH 53:7). A quantificação da cumarina foi realizada utilizando um padrão externo (1,2-benzopirona - Sigma-Aldrich). Para a construção da curva de calibração, houve preparo de soluções em concentrações de 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,50mg/L, que foram injetadas em triplicatas. Logo, a partir da equação da reta obtida, com a curva de calibração, foi possível calibrar a concentração de cumarina no extrato etanólico e na nanodispersão.

### 5.5 Fluxo de íons prótons (H<sup>+</sup>)

No presente estudo, foram realizadas de fluxo de íons prótons sob duas condições: contínuo e descontínuo, no meio de medição do SIET (meio mínimo (+) teor de cumarina em extrato de guaco) e (meio mínimo (+) teor de cumarina em nanodispersão).

A medição do fluxo de íons foi realizada em raízes de *Allium cepa*, com 5mm de comprimento (Figura 5) nas concentrações de 0,001; 0,002; 0,004; 0,008 e 0,016 mg/mL de cumarina do extrato de guaco; controle negativo (CN); cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP) e metil-metano-sulfonado (MMS) como controle positivo (CP).



Figura 5: Foto da raiz de *Allium cepa* (5mm de comprimento) fixada à placa de petri para medição do fluxo de iônico. Ainda sem o meio mínimo de medição (Foto: Arquivo pessoal).

O fluxo de prótons no meio extracelular foi medido de acordo com (FEIJÓ et al., 1999) e (RAMOS et al., 2008). Os microeletrodos vibráteis ion-específicos foram produzidos como descritos por Feijó e outros (1999). Esses foram produzidos de microcapilares de borosilicato com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior ([www.sutter.com](http://www.sutter.com)), utilizando o aparelho (Figura 6) *Puller Flaming Brown, Sutter P-98* (*Sutter Instruments, Novato, CA*). Posteriormente, os microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1L) e secos em estufa à 250° C por 3 horas. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina ( $C_5H_{15}NSi$ , Fluka 41716), ainda na estufa por 20 minutos e deixados para secar por mais 3 horas, na mesma temperatura.



Figura 6: Momento da confecção dos microelétrodos de borosilicato a partir do equipamento *Puller Flaming Brown, Sutter P-98* (*Sutter Instruments, Novato, CA*) (Foto: Arquivo pessoal).

Desta forma, após a vaporização com silano ( $C_5H_{15}NSi$ ), os microeletrodos foram preenchidos (Figura 7) com uma solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM  $KH_2PO_4$ , pH 6.0, para  $H^+$ ).



Figura 7: Momento de preenchimento do eletrodo com solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0, para  $\text{H}^+$ ; 100 mM KCl para ânions e potássio; 100 mM  $\text{CaCl}_2$  para  $\text{Ca}^{2+}$ ) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo (Foto: Arquivo pessoal).

Depois dessa etapa, a ponta foi preenchida (Figura 8) com uma coluna de 20 a 25  $\mu\text{m}$  do respectivo coquetel seletivo, contendo os ionóforos respectivos aos íons estudados (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido, na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (*World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA*).

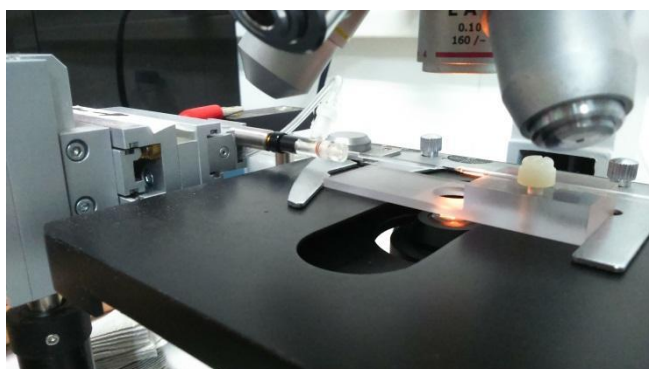


Figura 8: Momento do preenchimento da ponta do eletrodo com uma coluna de 20 a 25  $\mu\text{m}$  do respectivo coquetel seletivo, com auxílio de um microscópio para suporte visibilidade da ponta (Foto: Arquivo pessoal).

O eletrodo de referência foi uma referência seca (DR1REF-2, *World Precision Instruments*), inserido no meio de banho da amostra. Sinais foram medidos pelo amplificador ([www.applicableelectronics.com](http://www.applicableelectronics.com)), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos por meio de motores posicionais (*stepper-motors*), os quais

permitem um movimento tridimensional (Figura 9). O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no *software* ASET (*Science Wares East*, Falmouth, MA – [www.sciencewares.com](http://www.sciencewares.com)). A calibração dos eletrodos será realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, com concentração conhecida: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM; dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados.

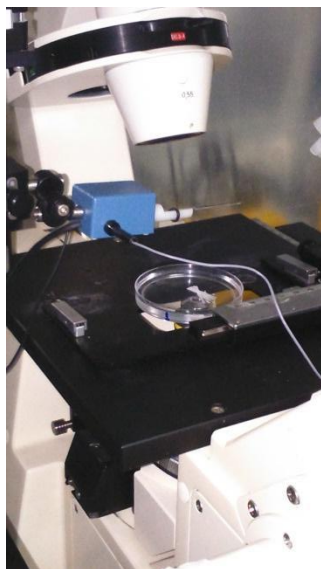


Figura 9: Momento da colocação do minieletrodo no equipamento para captação dos íons de forma tridimensional (Foto: Arquivo pessoal).

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, foi realizada pelo *software* ASET (Figura 10 e 11), que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto  $[x, y, z]$  do espaço, por meio da lei de Fick ( $J = D (dc/dx)$ ). O coeficiente de difusão ( $D$ ) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com *Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.*). A diferença espacial ( $dx$ ) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo ( $10 \mu\text{m}$ ). A diferença de concentração ( $dc$ ) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante ao processo de calibração.

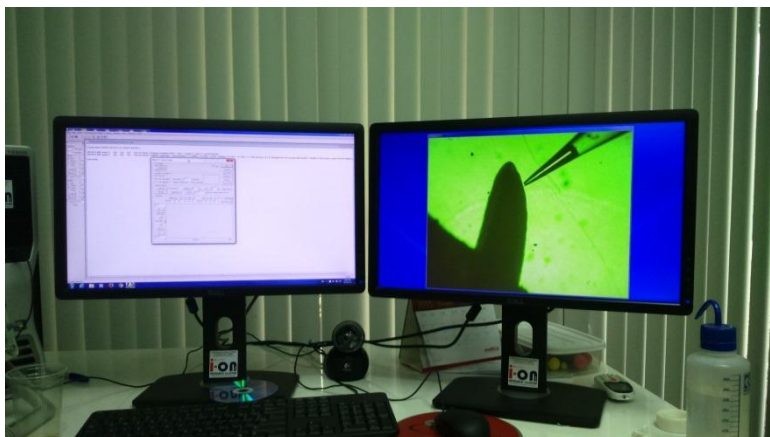


Figura 10: Visão do *software* ASET no momento da captação dos íons pelo minieletrodo (Foto: Arquivo pessoal).

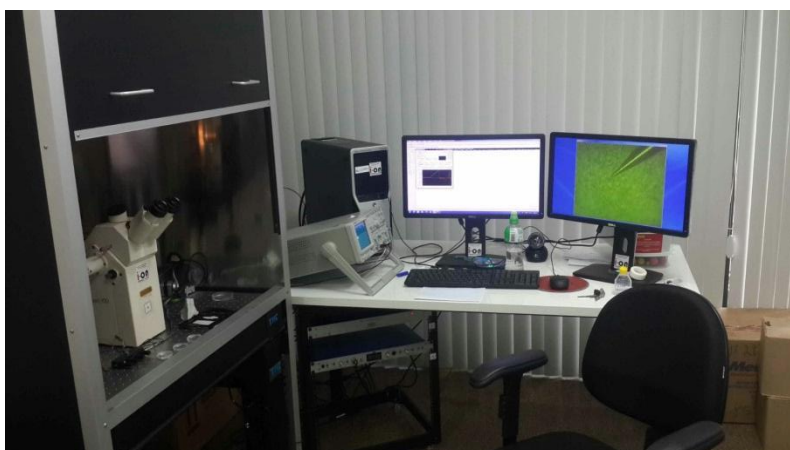


Figura 11: visão ampla do equipamento onde está localizado o minieletrodo para captação do fluxo de íons e do *software* ASET que captura as informações em tempo real (Foto: Arquivo pessoal).

### 5.6 Atividade alelopática

As sementes de *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface) foram selecionadas de mesmo lote de fabricação e submetidas à germinação, a fim de testar a alelopatia e os efeitos sobre o desenvolvimento inicial das plantas determinados pela concentração de cumarina em extrato etanólico de *Mikania glomerata*. Para tanto, foram realizados tratamentos com diferentes concentrações do extrato de acordo com nos seus teores de cumarina (0,001; 0,002; 0,004, 0,008 e 0,016 mg/mL de cumarina de extrato). Para o controle negativo (CN), foi utilizada água destilada. No caso do controle positivo, foi empregada cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP).

As sementes foram colocadas em placas de Petri forradas com papel filtro, nas quais foram adicionados 5mL do extrato de *M. glomerata* de cada uma das concentrações ou controles testados, sendo distribuídas 30 sementes por placa e cada tratamento feito em triplicata, totalizando 90 sementes. As sementes foram mantidas sob observação durante quatro dias e, a cada 24 horas, quando foram mensurados, o número de sementes germinadas e o comprimento das radículas com o auxílio do *software* gratuito, ImageJ.

Para mensurar efeito alelopático, foram considerados: porcentagem do índice de germinação (%IG), índice de alelopátia (%IA), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade do crescimento radicular (IVCR).

### 5.7 Atividade mutagênica – Ensaio *Allium cepa*

O teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas foi realizado com base no protocolo estabelecido por Grant (1982). A avaliação foi padronizada com sementes de *Allium cepa* (cebola) variedade Baia periforme de mesmo lote, sendo germinadas em diferentes concentrações de cumarina presente em extrato de *M. glomerata* e nanodispersão em condição contínua e descontínua.

#### 5.7.1 Tratamento contínuo e descontínuo

Para esta avaliação, foi empregado o *Allium cepa*, sendo que ele foi avaliado nas concentrações 0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de cumarina de extrato de *M. glomerata*. Seguindo procedimento descrito por Fiskesjö (1985), as sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinação em água destilada (CN), em solução de metilmetanosulfonato (MMS)  $4 \times 10^{-4}$  M - controle positivo (CP) e nas concentrações de tratamento (0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de cumarina de extrato de *M. glomerata*). As sementes germinaram diretamente nos tratamentos, sendo, portanto, caracterizados como tratamento contínuo.

Para tratamento descontínuo (Figura 12), as sementes foram primeiramente germinadas em água destilada (CN), em papel filtro, e, quando houve a protusão das raízes, foram colocadas em contato com as concentrações de estudo (0,001; 0,002; 0,004 mg/ml de cumarina de extrato de *M. glomerata*). Seguidos de indução de 24



horas, 48 horas e Recuperação 48 horas com água destilada em todas as concentrações.

Após o período de germinação e indução, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente colocadas em refrigeração.

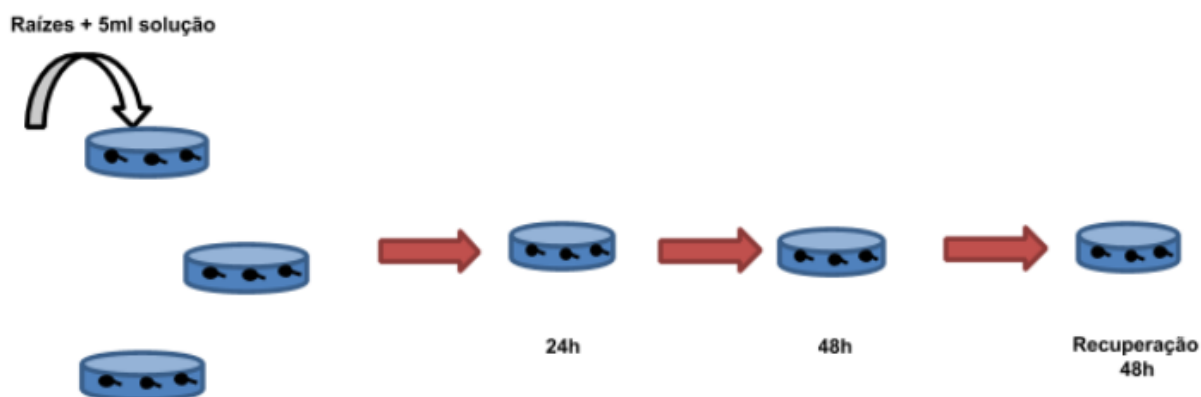


Figura 12: Esquema do tratamento descontínuo, onde nas etapas de 24h, 48h e Recuperação parte das raízes submetidas eram retiradas e fixadas em Carnoy para posterior análises mutagênicas.

### 5.7.2 Preparo das lâminas citogenéticas

Durante a confecção das lâminas, inicialmente, as raízes foram submetidas à hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl 1N) a 60°C, por 5 minutos e, posteriormente lavadas com água destilada. Para coloração, o material foi exposto ao Reativo de Schiff, por 48 minutos, em local protegido de luz, sendo o esmagamento da ponta da raiz realizado em uma gota deorceína acética 1%. As lamínulas foram descoladas com nitrogênio líquido e secas à temperatura ambiente, sendo fixadas com Entellan, tornando-as permanentes.

Para contagem das células, foram utilizadas cinco lâminas de cada tratamento, sendo contabilizadas 1000 células por lâmina, em microscópio óptico, em aumento de 40X, totalizando 5000 células analisadas por tratamento.

### 5.7.3 Análise das lâminas citogenéticas

Diante do que foi citado por Costalonga (2009), após a análise da região meristemática das raízes, foram calculados os índices mitóticos, índice de efeito



aneugênico e índice de efeito clastogênico, foi obtido pela frequência de aberrações cromossômicas no ciclo celular: células binucleadas, C-metáfase, micronúcleo, perda, aderência, anáfase multipolar, pontes e atrasos na anáfase e na telófase.

O efeito citotóxico foi calculado pelo índice mitótico (IM), onde:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Para o efeito genotóxico, foi calculado pelo índice de aberração (IA), onde:

$$\text{IA} = \frac{\text{Número de células aberrantes}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Para efeitos aneugênicos, foram analisadas células em divisão portadoras de metáfases irregulares (c-metáfases), alterações em anáfases, alterações em telófases (atrasos), células binucleadas e/ou multinucleadas e perdas cromossômicas.

$$\text{IEC} = \frac{\text{Número de células aneugênicas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Em relação aos possíveis efeitos clastogênicos, avaliou-se a frequência de células portadoras de alterações tal como aderência, pontes e quebras cromossômicas, além de células portadoras de micronúcleos de morte celular.

$$\text{IEC} = \frac{\text{Número de células clastogênicas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

### 5.8 Organismos testes vegetais

A utilização de organismos vegetais para testes é menos complexa e, muitas vezes, esses organismos possuem maior sensibilidade, quando comparados a outros métodos e quando utilizados para detectar possíveis efeitos genotóxicos no meio ambiente (YI et al., 2007). O *Allium cepa* é um reconhecido bioindicador de genotoxicidade, podendo ser utilizado para monitoramento ambiental e avaliação da mutagenicidade de muitos compostos químicos, além de possuir cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), sendo fatores importantes para facilitar os estudos de avaliação de danos cromossômicos em células meristemáticas (BAGATINI et al., 2007). Além disso, a espécie *Lactuca sativa* é muito utilizada para monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas e em estudos de avaliação alelopática (MACHADO SOUZA et al., 2005).

### 5.9 Estatística

Todos os dados foram avaliados usando ANOVA, seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPadPrism (*GraphPad Software, San diego, CA*) com nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Fluxo de Prótons

#### Tratamento Contínuo

Foi realizado um teste dose-efeito, no qual foi medido o fluxo extracelular de  $H^+$  *in vivo* (Figura 13), o qual revelou a concentração ideal de estudo. Foi possível observar que todos os tratamentos promoveram uma inibição do fluxo de  $H^+$  (Figura 14), quando comparado ao controle negativo, sendo que a maior inibição do fluxo de  $H^+$  foi provocada pelo extrato etanólico contendo cumarina (0,002 mg/mL), sem qualquer efeito de ruído na análise.

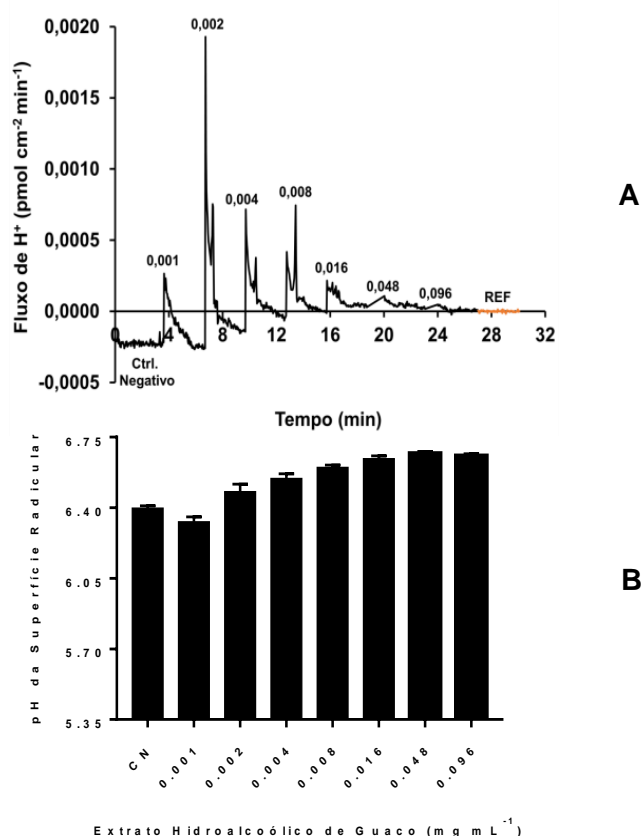


Figura 13: Fluxos de  $H^+$  (A) e médias dos valores de pH da superfície radicular (B) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* com diferentes concentrações (mg/mL) de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (guaco) adicionadas gradualmente no momento da medição. Valores em laranja representam a referência do meio de medição. CN (Controle Negativo = 0,0 mg/mL).

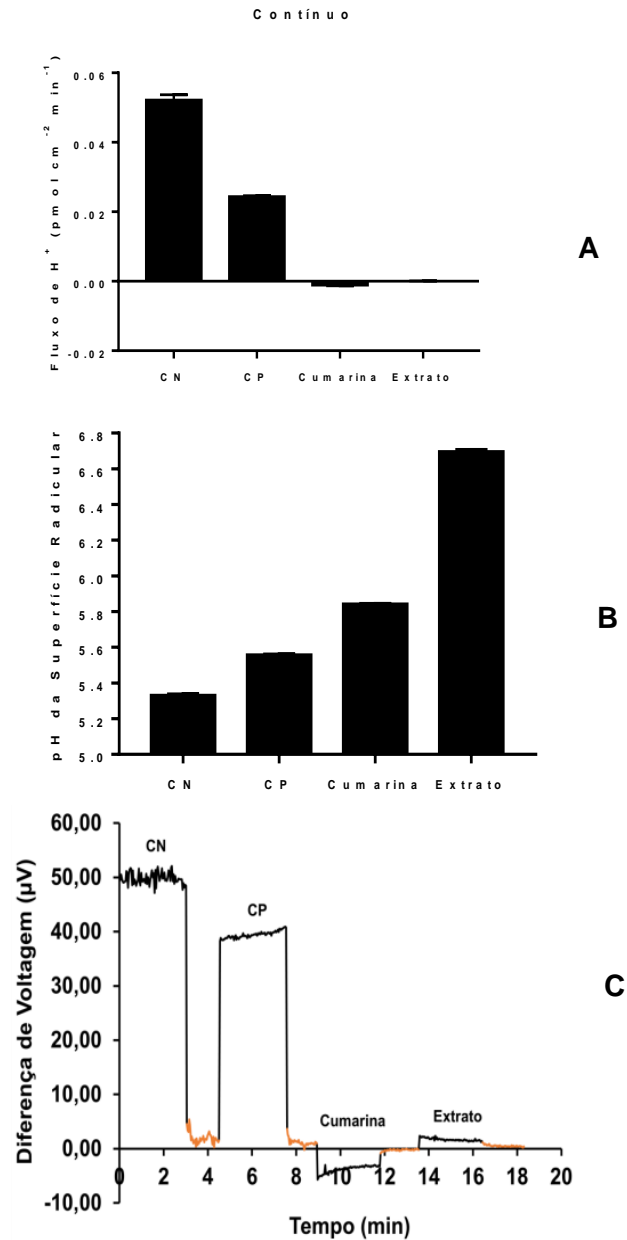


Figura 14: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL).

No tratamento descontínuo (Figura 15), nas primeiras 24h, tanto o extrato, quanto a cumarina pura, ambos nas concentrações 0,002 mg/mL, inibiram o fluxo de  $H^+$ . Posteriormente, na fase crônica de 48h (Figura 16), ambos os tratamentos inverteram o fluxo de  $H^+$ , passando de efluxo para influxo, mantendo o mesmo comportamento durante a recuperação.

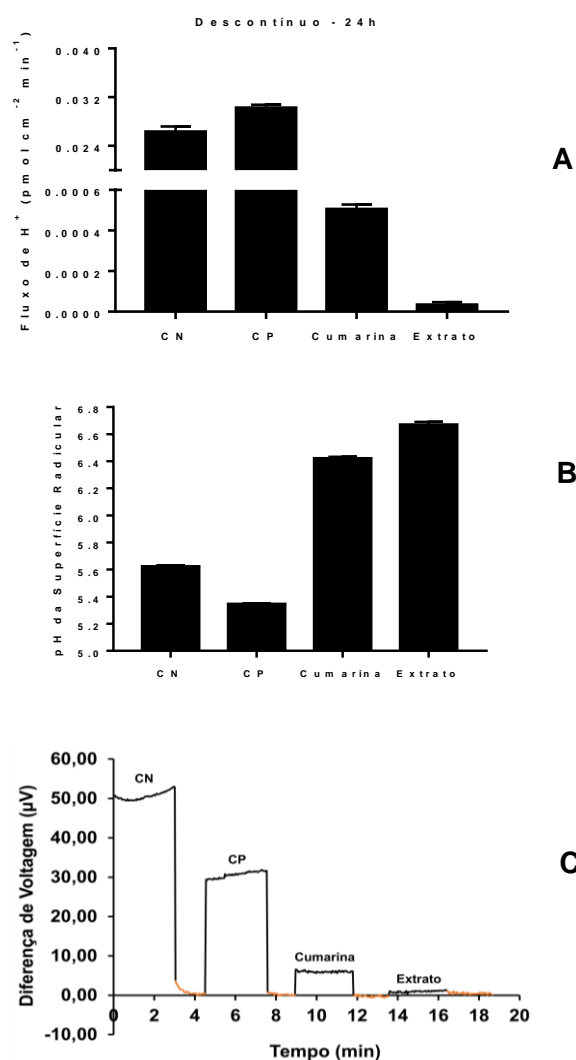


Figura 15: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (Guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL).

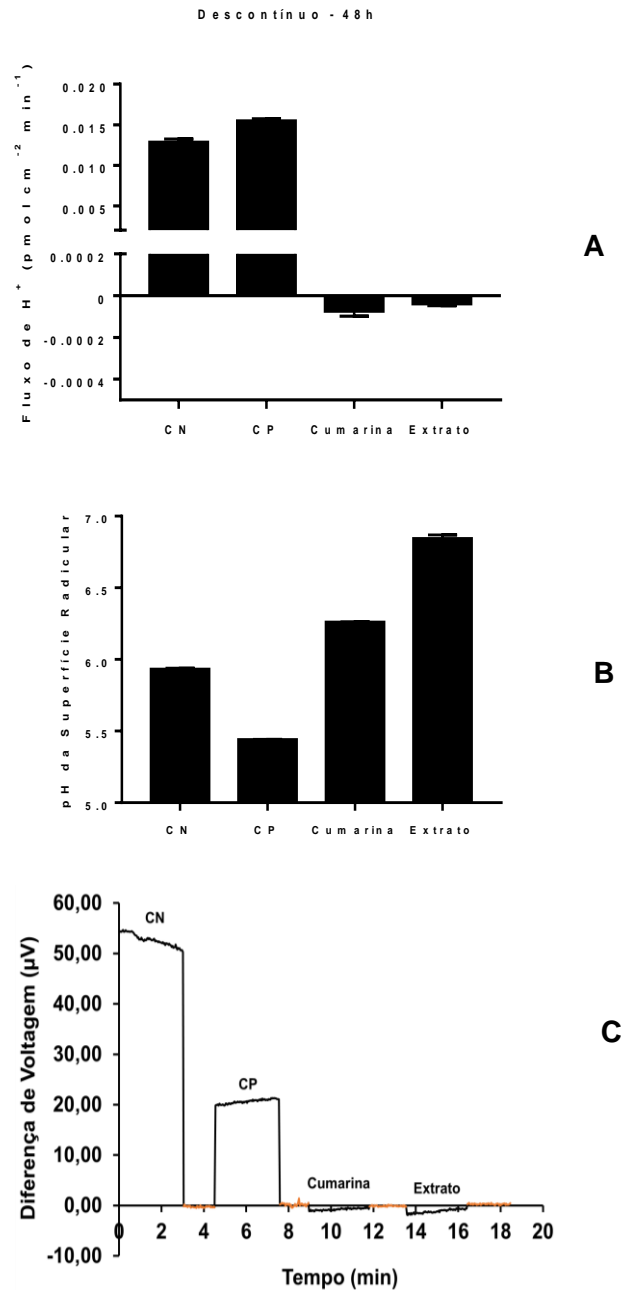


Figura 16: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 48h. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (Guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL).

Para o momento de Recuperação (figura 17), é possível verificar que o comportamento se mantém entre extrato e cumarina, sendo mais expressivo para cumarina pura 0,002 mg/mL.

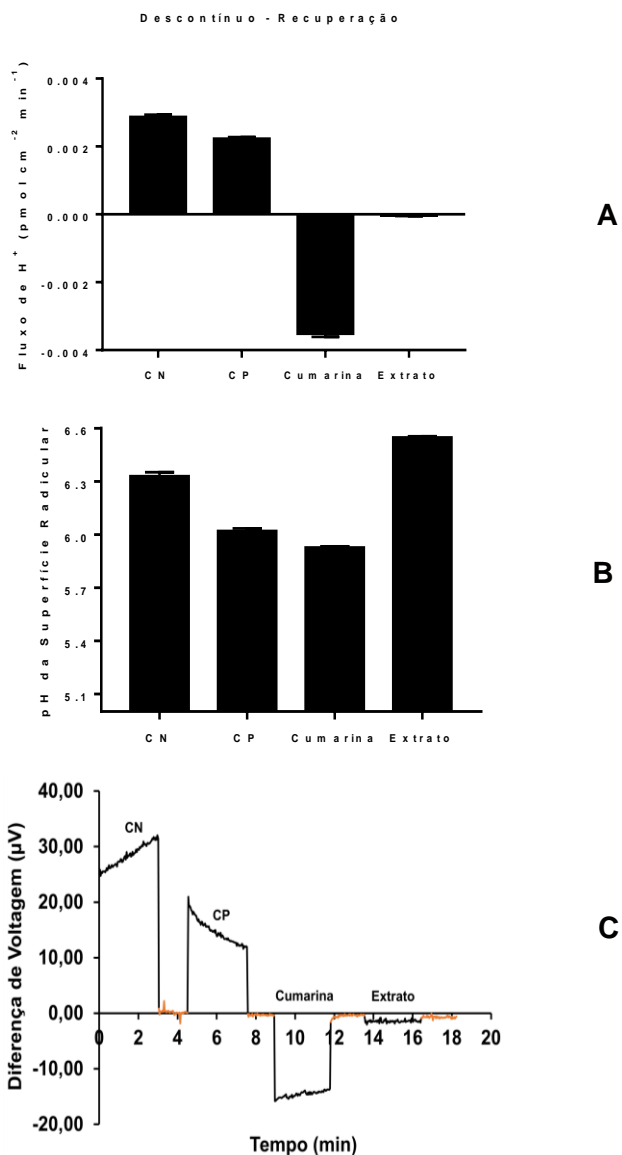


Figura 17: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa*. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – recuperação. As concentrações de cumarina e de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (guaco) utilizadas foram de 0,002 mg/mL. CN = Controle Negativo (0,0 mg/mL), CP = Controle Positivo (cumarina pura em concentração de 0,02 mg/mL).

Para o fluxo de  $H^+$  no tratamento contínuo de nanodispersão com teor de cumarina (0,002 mg/mL) presente em *Mikania glomerata*, é possível verificar que todos os tratamentos, contínuo (Figura 18) e descontínuo 24h (Figura 19), alteraram o fluxo de  $H^+$  de forma diferenciada, não apresentando um padrão de fluxo, como apresentado no extrato.

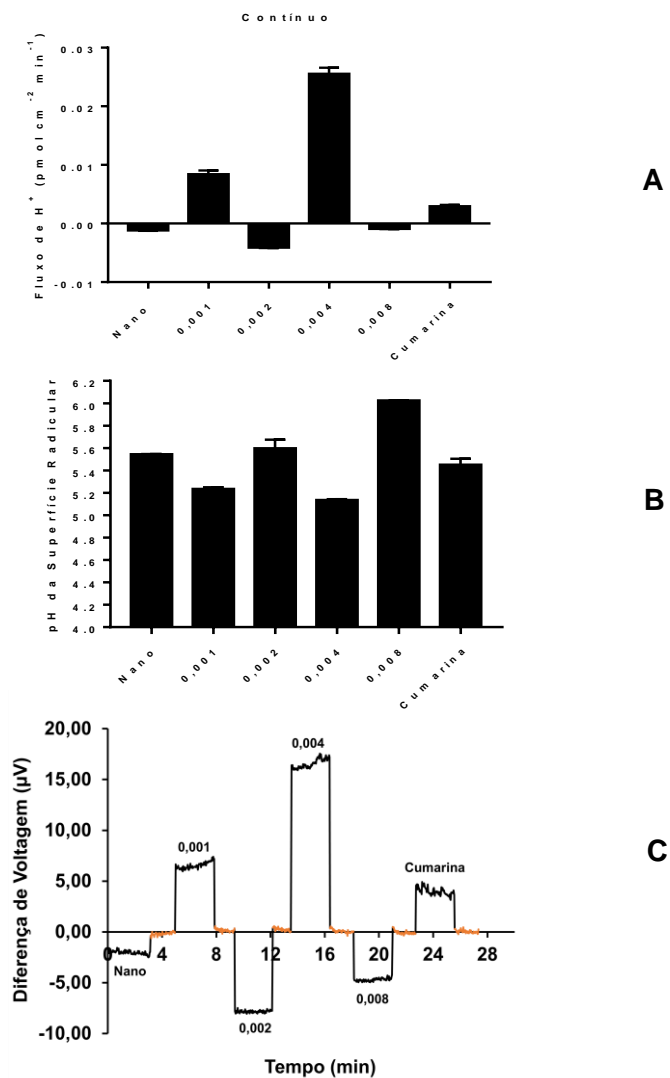


Figura 18: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo contínuo.



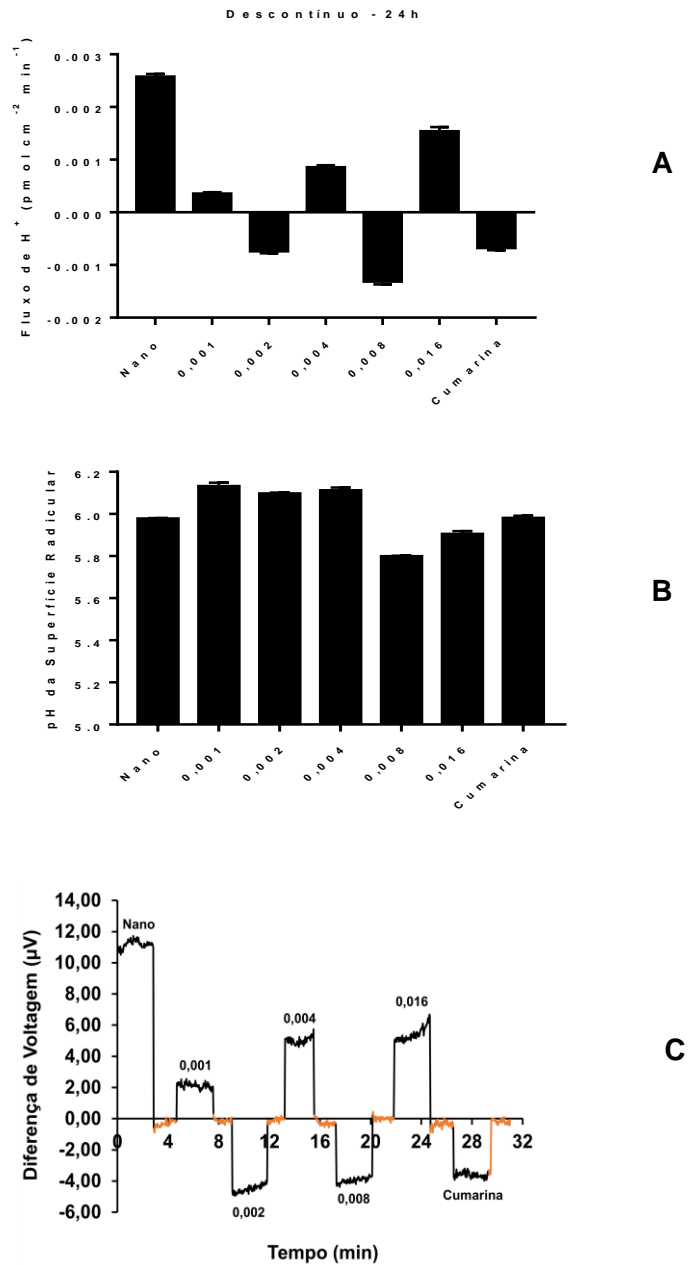


Figura 19: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de H<sup>+</sup> (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 24h.

Para o tratamento descontínuo 48h (Figura 20), o fluxo de  $H^+$  passou a apresentar um padrão onde, a partir da concentração de 0,002 mg/mL, apresentou uma inibição do fluxo de  $H^+$ , passando para influxo.

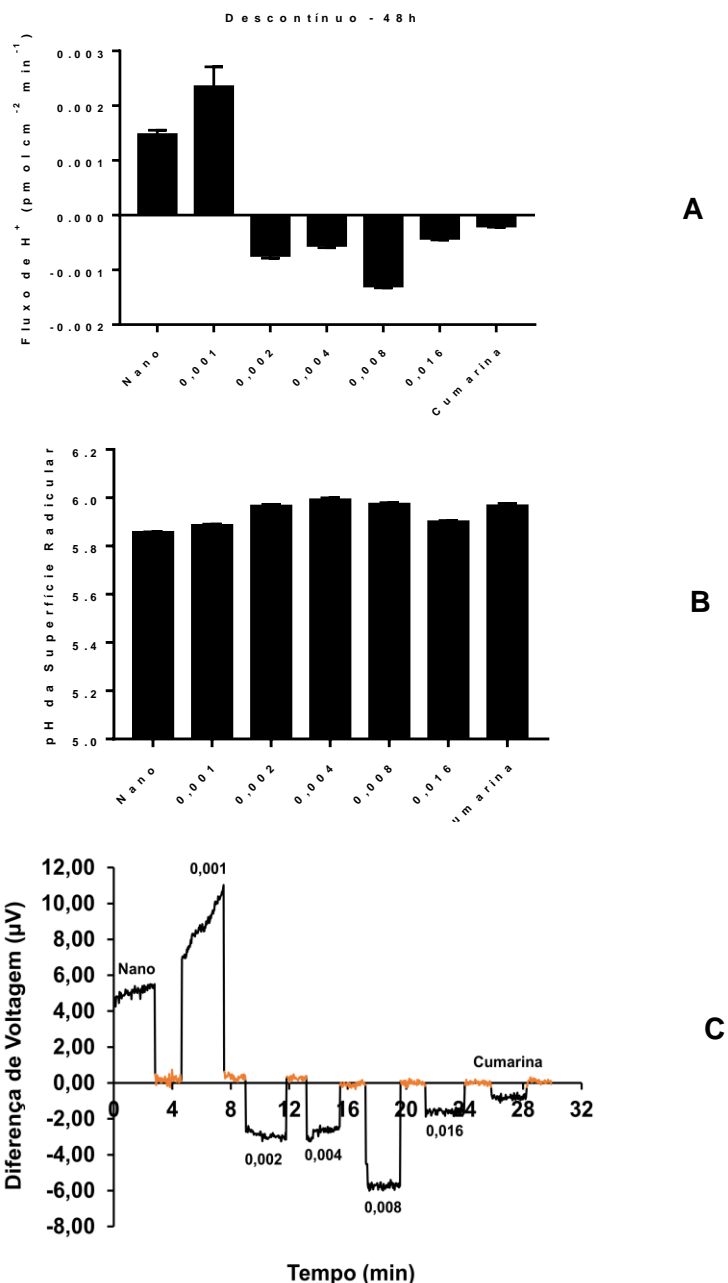


Figura 20: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo – 48h.

Para o tratamento de recuperação, os tratamentos que antes estavam em influxo, com excessão da cumarina, voltaram para efluxo. No entanto, alguns dos tratamentos ainda apresentam inibição da bomba de  $H^+$ , mesmo que em efluxo (Figura 21).

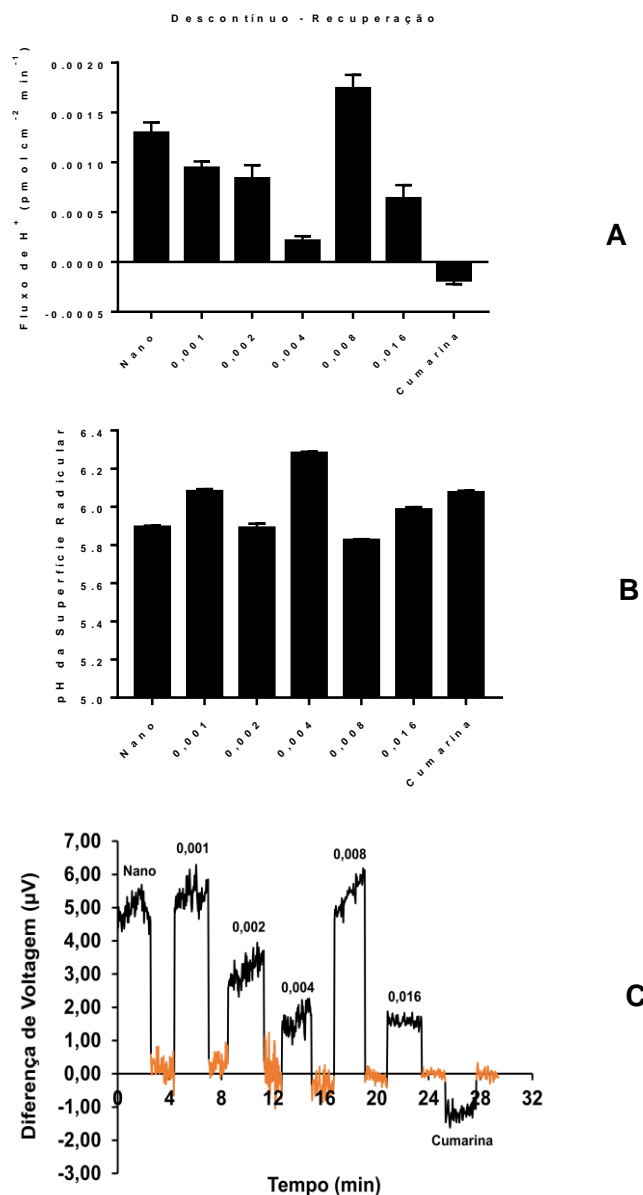


Figura 21: Representação gráfica das médias dos valores dos fluxos de  $H^+$  (A), das médias dos valores do pH da superfície radicular (B) e da diferença de voltagem (C) detectados na zona de alongamento da raiz principal de *Allium cepa* crescida em diferentes concentrações (mg/mL) de extrato hidroalcoólico (70%) de *Mikania glomerata* (Guaco) em nanodispersão ou em cumarina (0,02 mg/mL). Nano = nanodispersão pura. O regime de medição adotado foi de modo descontínuo - recuperação.

Para as avaliações de fluxo de  $H^+$ , é possível observar que as concentrações do extrato apresentaram um padrão e, conseqüentemente, foi possível observar uma melhor dose de trabalho. O que não foi possível observar para as concentrações de nanodispersões em que, mesmo trabalhando com muitas concentrações, a ela não apresentou um padrão para a bomba de  $H^+$ , apresentando ora efluxo, ora influxo dentro do mecanismo da bomba.

Para o ineditismo desta pesquisa, desenvolver trabalho com este tipo de nanoestrutura juntamente com fluxo de  $H^+$ , é possível salientar a importância de dar continuidade a trabalhos como este e, possivelmente, aumentar o tempo de análise do fluxo de  $H^+$  até que se consiga achar um padrão e, assim, uma melhor dose de trabalho.

## 6.2 Avaliação alelopática

Analisando a atividade alelopática, foi possível verificar que o extrato de *M. glomerata*, quando testado em *Lactuca sativa*, apresentou um aumento significativo do índice de alelopatia (%IA) a partir da concentração de 0,004 mg/mL de cumarina no extrato etanólico, uma vez que esse índice é indicativo de alelopatia negativa, quando os valores ultrapassam o limite de 50%.

O mesmo resultado foi evidenciado no tratamento com a concentração de 0,002 mg/mL de cumarina pura. Quanto ao índice de germinação, foi evidenciada uma queda desse parâmetro mediante o aumento da concentração de cumarina nos extratos, demonstrando um comportamento dose-dependente (Tabela 2).

**Tabela 2:** Índice de alelopatia para as sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 mg/mL<sup>-1</sup> de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (guaco).

Amostras	Concentrações (Teor Cumarina)	Nº total de sementes	Nº sementes germinadas	Índice de germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
CN	-	90	65	72,22	-
CuP	0,002	90	32	35,56	50,77
Extrato guaco	0,001	90	46	51,11	29,23
	0,002	90	46	51,11	29,23
	0,004	90	22	24,44	66,15
	0,008	90	4	4,44	93,85
	0,016	90	0	0	100

Em relação ao Índice de Velocidade de Germinação (IVG), foi possível observar que todas as concentrações de cumarina contidas no extrato ocasionaram um retardamento na germinação das sementes, todavia, isso foi mais expressivo nas concentrações de 0,008 e 0,016 mg/mL de cumarina contida no extrato etanólico (Figura 22).

Assim, isso, evidencia que as maiores concentrações de cumarina contidas no extrato (0,008; 0,016 mg/mL), e a cumarina pura proporcionaram um declínio na germinação mais expressiva quando comparadas ao controle negativo.

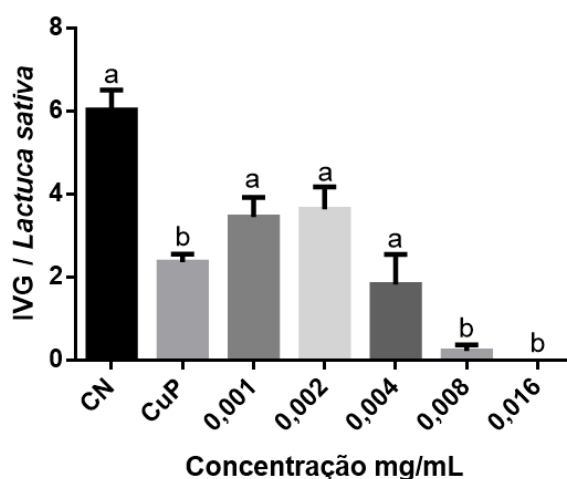


Figura 22: Índice de velocidade de germinação do do cultivar *Lactuca sativa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

Na avaliação do crescimento radicular médio (CRM) (Figura 23 A) e do índice de velocidade de crescimento da raiz (IVCR) (Figura 23 B), foi possível observar uma uniformidade de comportamento entre as concentrações estudadas, exceto nas concentrações de cumarina 0,008 e 0,016 mg/mL

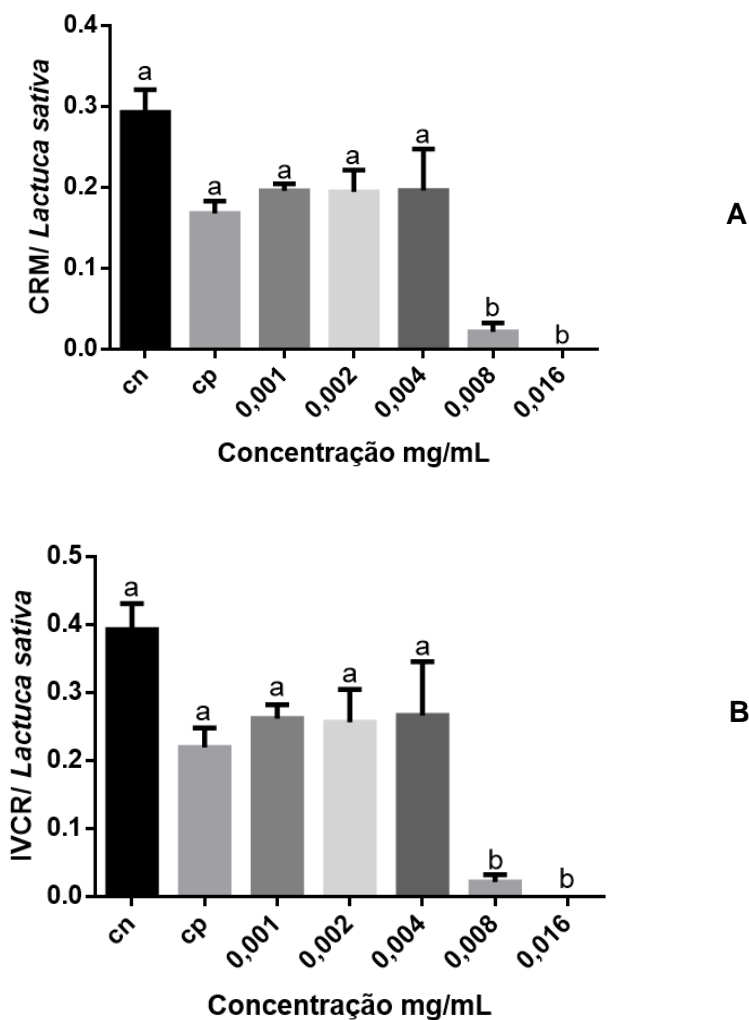


Figura 23 : Crescimento radicular médio (CRM) e índice da velocidade do crescimento radicular (IVCR) do cultivar *Lactuca sativa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

Para dados de alelopatia de nanodispersão de *Mikania glomerata* em *Lactuca sativa*, é observado que todos os tratamentos interferiram no índice de alelopatia (tabela 3), apresentando acima de 50% deste índice. Sendo que, na concentração de 0,002 mg/mL, a concentração evidenciada no fluxo de prótons se mostrou como a melhor que inibiu o fluxo, e, na alelopatia, houve um alcance de 100% de inibição.

**Tabela 3:** Índice de alelopatia para as sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de nanodispersão de *Mikania glomerata* (Guaco).

Amostras	Concentrações (Teor Cumarina)	Nº total de sementes	Nº sementes germinadas	índice de germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
CN	-	90	65	72,22	-
CuP	0,002	90	32	35,56	50,77
Extrato guaco	0,001	90	1	3,33	98,46
	0,002	90	0	0	100
	0,004	90	0	0	100



No índice de velocidade de germinação (Figura 24) é possível verificar que as concentrações a partir de 0,001 mg/mL diminuem o efeito da germinação chegando em sua maior concentração a alcançar a alelopatia negativa por completo. Fato que pode ser explicado pela porcentagem de germinação (%IG) (Figura 25) que é perceptível um declive acentuado nas concentrações estudadas quando comparadas ao controle negativo.

Em parâmetros de crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento de raiz (IVCR) (Figura 26), é possível evidenciar com clareza o efeito direto da nanodispersão, uma vez que estatisticamente as concentrações de nanodispersão de *M. glomerata* apresentaram comportamento equivalente ao da cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL.

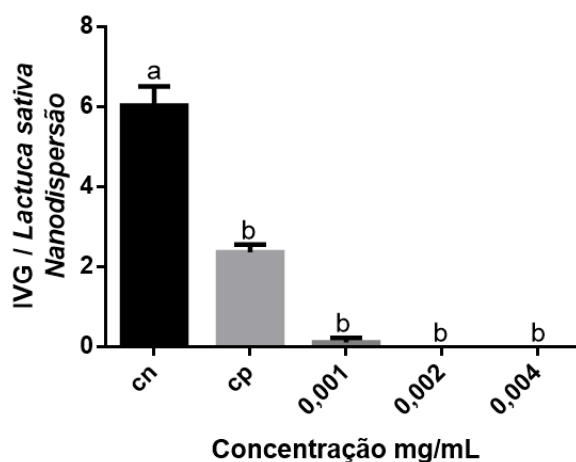


Figura 24: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

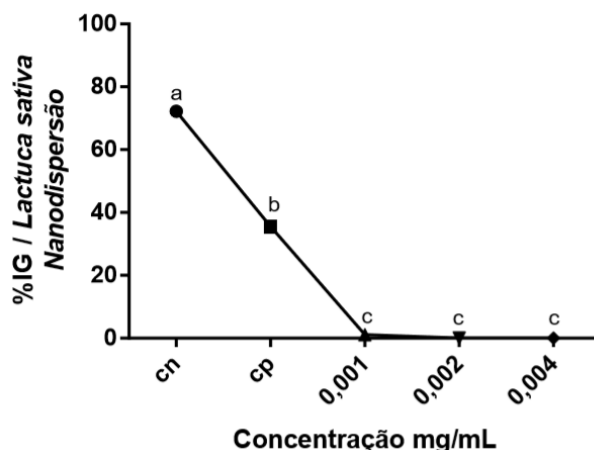


Figura 25: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

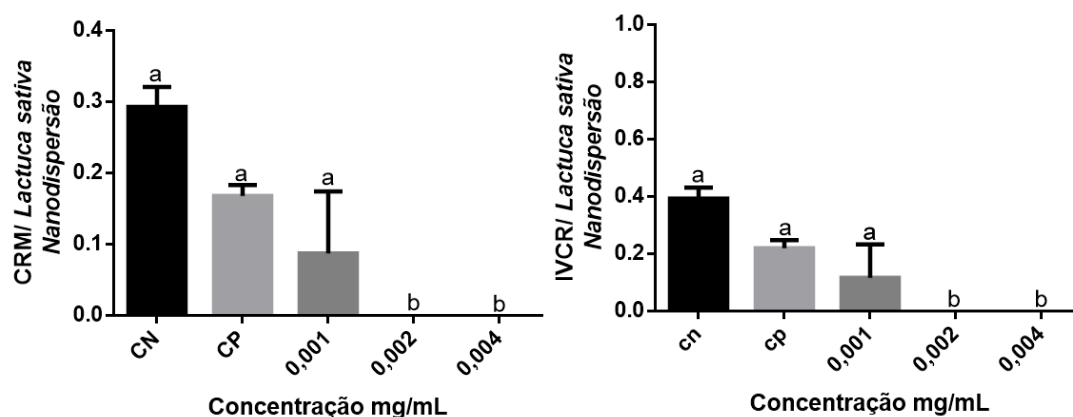


Figura 26: Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) do cultivar *lactuca sativa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

Na avaliação do efeito alelopático do extrato de *Mikania glomerata* sobre o *Allium cepa*, foi possível verificar que o índice de alelopatia (%IA) ultrapassou o índice significativo de 50%, a partir da concentração 0,004 mg/mL de teor de cumarina. Aliás, não foi evidenciado efeito alelopático na concentração de cumarina pura a 0,002 mg/mL (Tabela 4).

Tabela 4: Índice de alelopatia para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 mg/mL de extrato etanólico de *Mikania glomerata* (Guaco)

Amostras	Concentrações (Teor Cumarina)	Nº total de sementes	Nº sementes germinadas	Índice de germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
CN	-	90	68	75,56	-
CuP	0,002	90	58	64,44	14,71
Extrato guaco	0,001	90	54	60	20,59
	0,002	90	41	45,56	39,71
	0,004	90	18	20	73,53
	0,008	90	11	12,22	82,82
	0,016	90	2	2,22	97,06

No índice de velocidade de germinação (Figura 27), é possível verificar que as concentrações de 0,008 e 0,016 mg/mL de cumarina de extrato de *M. glomerata* determinaram uma queda da germinação significativamente, mais expressiva que as demais, proporcionando um retardo na germinação.

Ao observar o índice de germinação (%IG) (Figura 28), é possível perceber que existe um declínio, dose-dependente na quantidade de sementes germinadas, em relação ao aumento da concentração de cumarina mg/mL contidas no extrato. Nos parâmetros de crescimento radicular médio (CRM) (Figura 29a) e no índice de velocidade de crescimento de raiz (IVCR) (Figura 29b), é possível observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

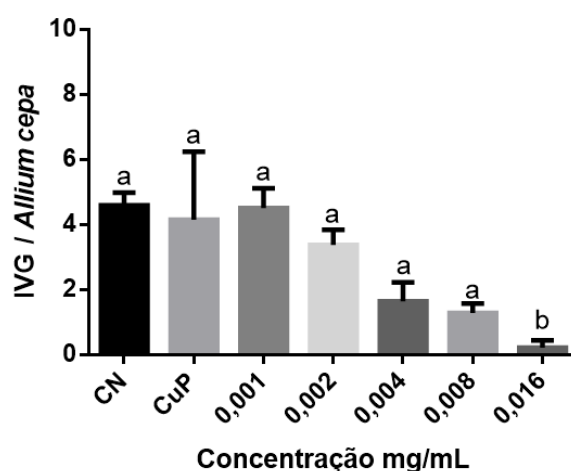


Figura 27: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

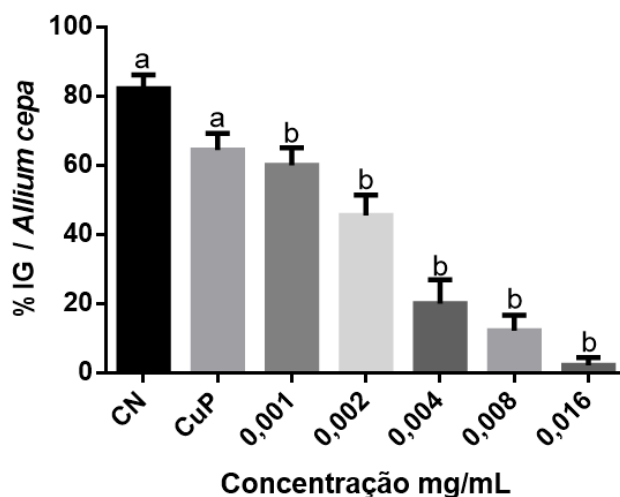


Figura 28: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

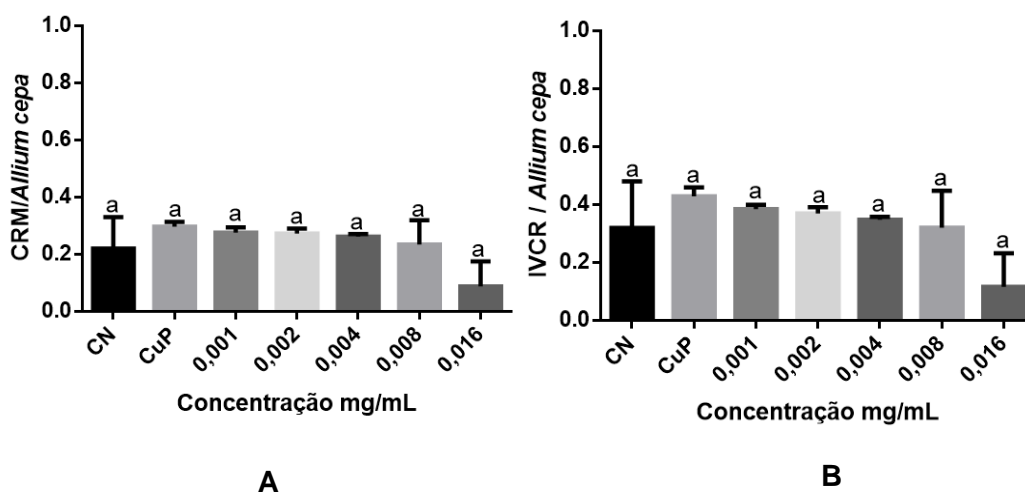


Figura 29: Crescimento radicular médio (CRM) e índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

Considerando os mesmos parâmetros de nanodispersão, quando analisados para *A. cepa*, é possível verificar que houve um mesmo comportamento, dentre as concentrações de nanodispersão de *Mikania glomerata* apresentando já na primeira concentração uma inibição de 98,53% de alelopátia (tabela 5).

No entanto, a cumarina pura, para esse organismo teste, não influenciou no índice, apresentando apenas 14,71% de inibição, justificando que, para essa concentração, houve uma resistência no comportamento alelopático.

Tabela 5: Índice de alelopatia para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura em concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e com as concentrações de cumarina 0,001; 0,002; 0,004 mg/mL de nanodispersão de Mikania glomerata (Guaco)

Concentrações (Teor Cumarina)	Nº total de sementes	Nº sementes germinadas	índice de germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
-	90	68	75,56	-
0,002	90	58	64,44	14,71
0,001	90	1	1,11	98,53
0,002	90	1	1,11	98,53
0,004	90	0	0,00	100

Para os dados de índice de velocidade de germinação (IVG), é possível salientar que houve um comportamento muito semelhante, quando comparado ao da *Lactuca sativa*, onde as concentrações de nanodispersão apresentam comportamento alelopático negativo, quando comparado ao controle negativo (figura 30). Tal comportamento se assemelha também para os índices de (%) IG (figura 31).

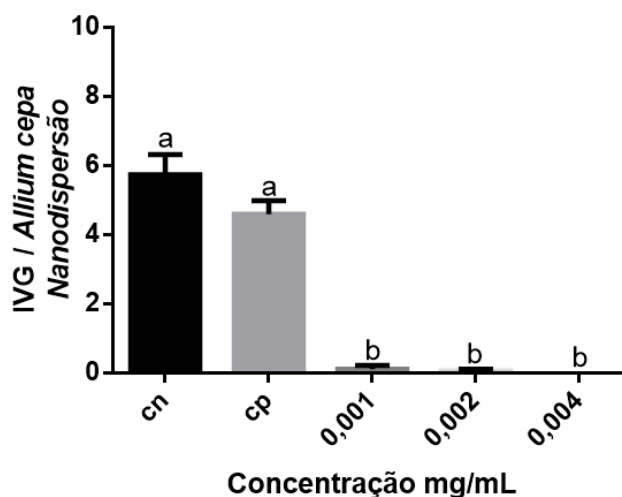


Figura 30: Índice de velocidade de germinação (IVG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

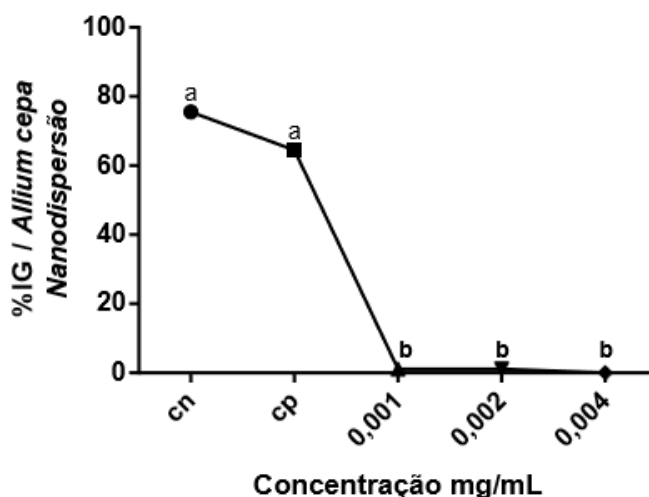


Figura 31: Porcentagem do índice de germinação (%IG) do cultivar *Allium cepa*, em resposta ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN), cumarina pura na concentração de 0,002 mg/mL (CuP) e quatro concentrações de cumarina mg/mL contidas no extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

### 6.3 Atividade mutagênica

É possível observar que as sementes, quando germinadas diretamente no extrato etanólico de *Mikania glomerata*, de forma contínua (Figura 31), não apresentaram diminuição significativa do seu índice mitótico, quando comparado ao controle negativo. Contudo, assim que as sementes são germinadas diretamente em nanodispersão, essas não germinam, ou não produzem quantidade de plântulas significativas para o estudo.

Porém, isso é visto de maneira diferente ao considerar os tratamentos descontínuos (Figura 32). Neles, as raízes estiveram em contato com as concentrações de extrato e apresentaram uma queda considerável do índice mitótico, quando comparados ao controle negativo, sendo na concentração 0,002 mg/mL na fase aguda (24h) mais expressivo, por não apresentar divisão celular. Aliás, essa mesma concentração na fase crônica (48h) apresenta um aumento desse índice do que na fase de recuperação, evidenciando novamente um decréscimo da sua divisão celular.

Já a concentração de 0,004 mg/mL, ela apresentou, na fase crônica (48h), uma ausência da divisão celular e, posteriormente, na fase de recuperação, houve um aumento desse índice.

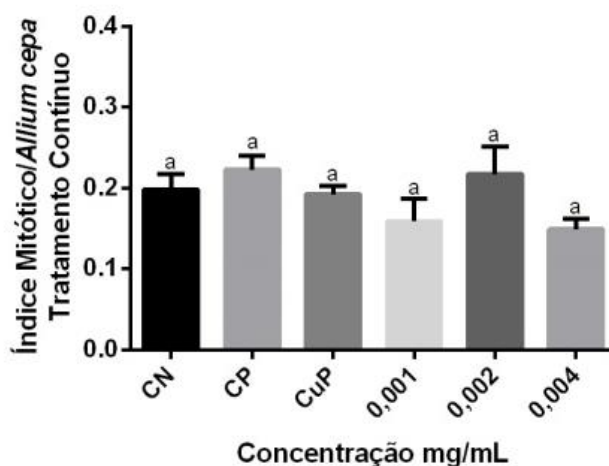


Figura 32: A) Índice mitótico B) Índice efeito aneugênico C) Índice efeito clastogênico. Em sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - mms (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de *Mikania glomerata*.



Os dados do tratamento contínuo, quando comparados ao controle positivo, evidenciam que o tratamento contínuo não apresenta diferença expressiva que possa salientar uma citotoxicidade. No entanto, quando se compara os dados do tratamento descontínuo, é visível a influência das concentrações de extrato de *Mikania* na divisão celular, apresentando capacidade citotóxica.

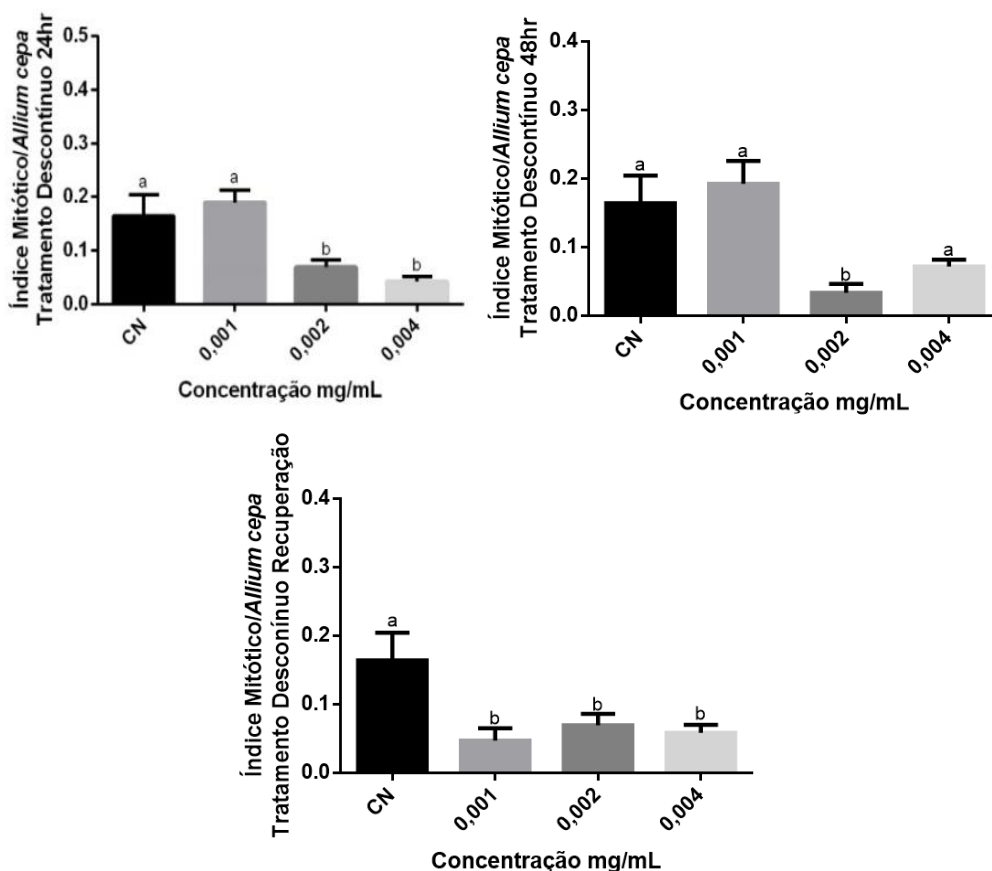


Figura 33: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de curcumina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Curcumina Pura 0,002 mg/mL (CuP).

A mesma capacidade pode ser evidenciada nos tratamentos descontínuos (figura 34) de nanodispersão contendo teor de curcumina de *Mikania glomerata*, onde todas as concentrações apresentaram queda significativa no índice mitótico.

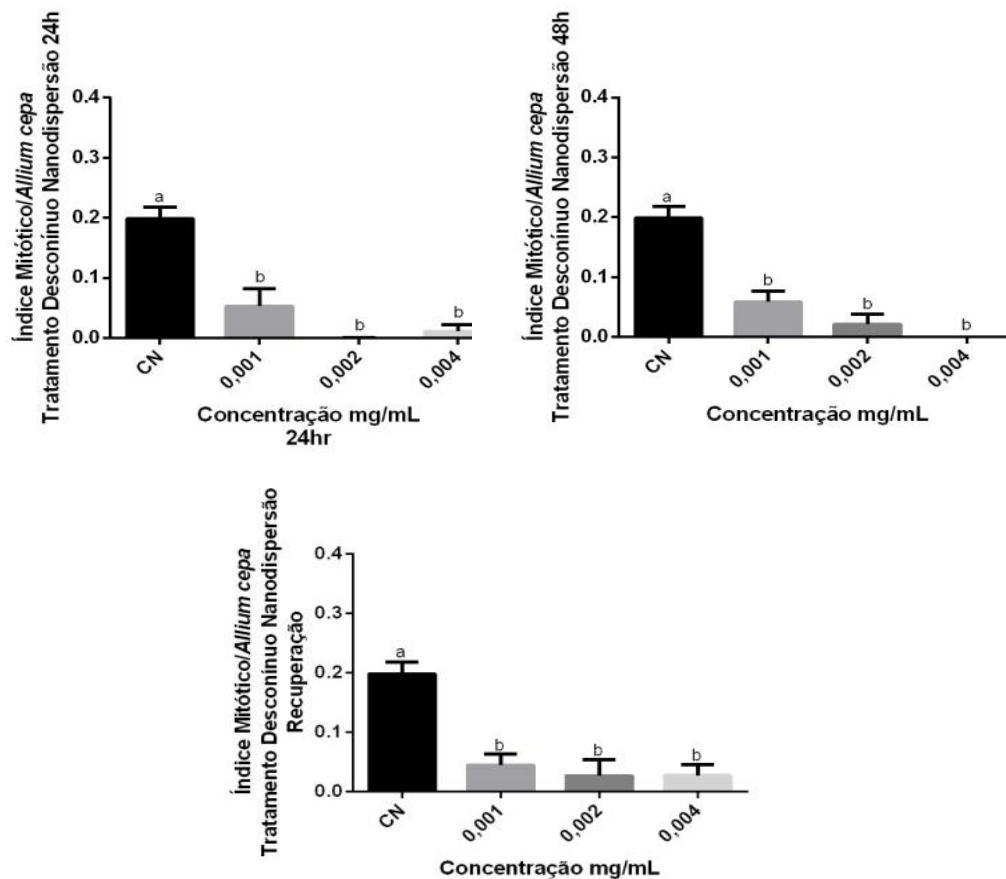


Figura 34: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP).

Para efeito aneugênico (Figura 34), no tratamento descontínuo, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

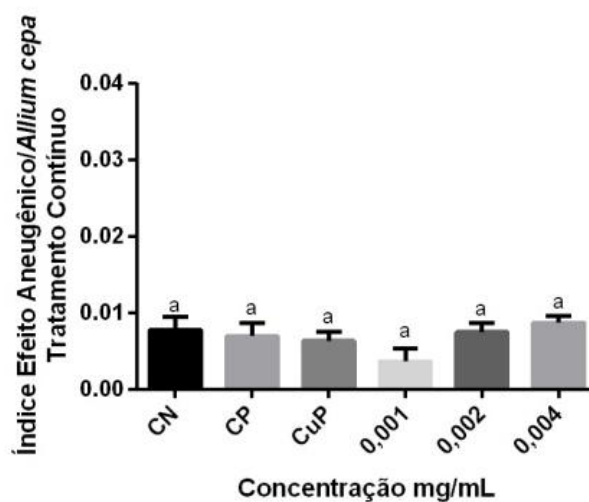


Figura 35: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de Guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP).

Para efeito aneugênico do tratamento descontínuo do extrato de *Mikania*, apenas a concentração de 0,001 mg/mL, no tratamento de recuperação, foi mais expressiva quando comparado ao controle negativo (Figura 35).

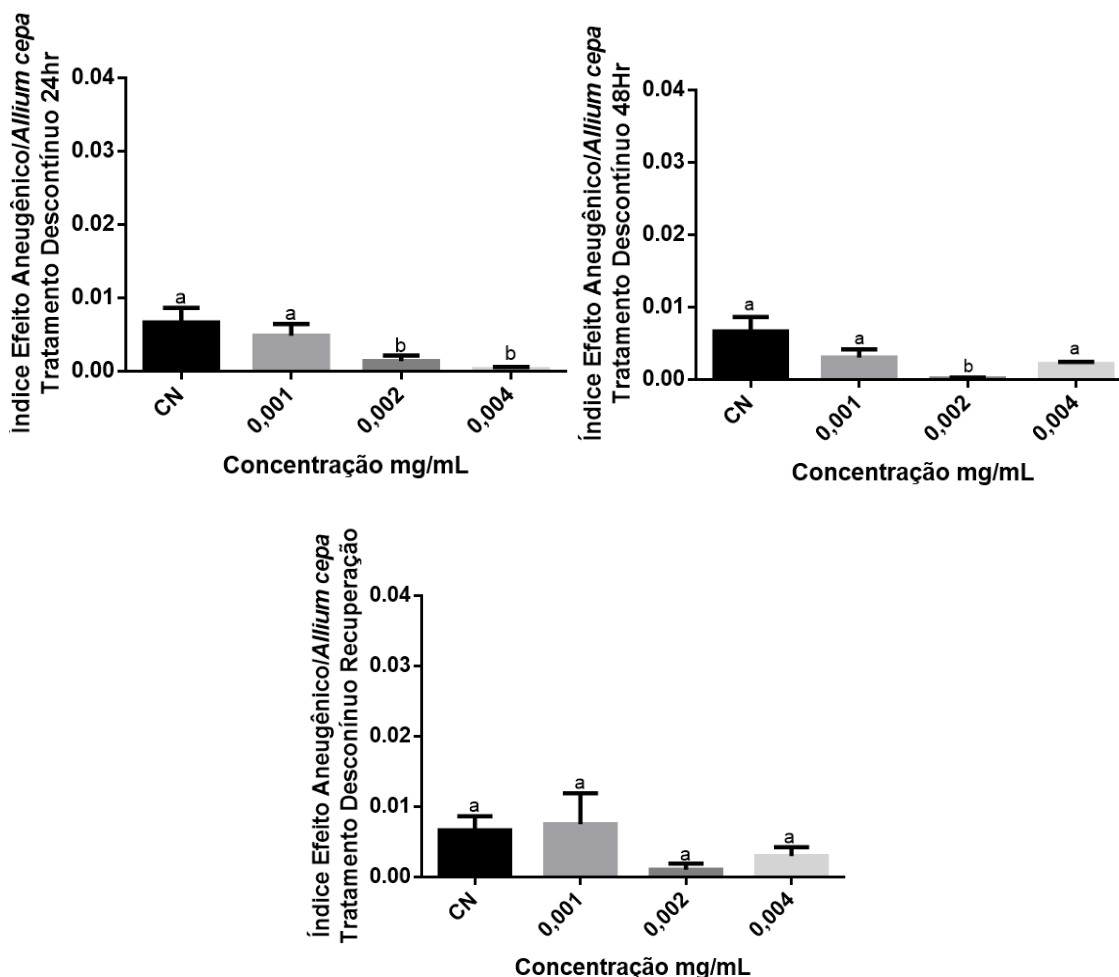


Figura 36: A) Índice mitótico B) Índice efeito aneugênico C) Índice efeito clastogênico. Em sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - MMS (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de *Mikania glomerata*.

Para os dados do efeito aneugênico da nanodispersão em tratamento descontínuo, também é possível observar que não houve diferença significativa entre as concentrações, quando comparadas ao controle negativo (Figura 36).

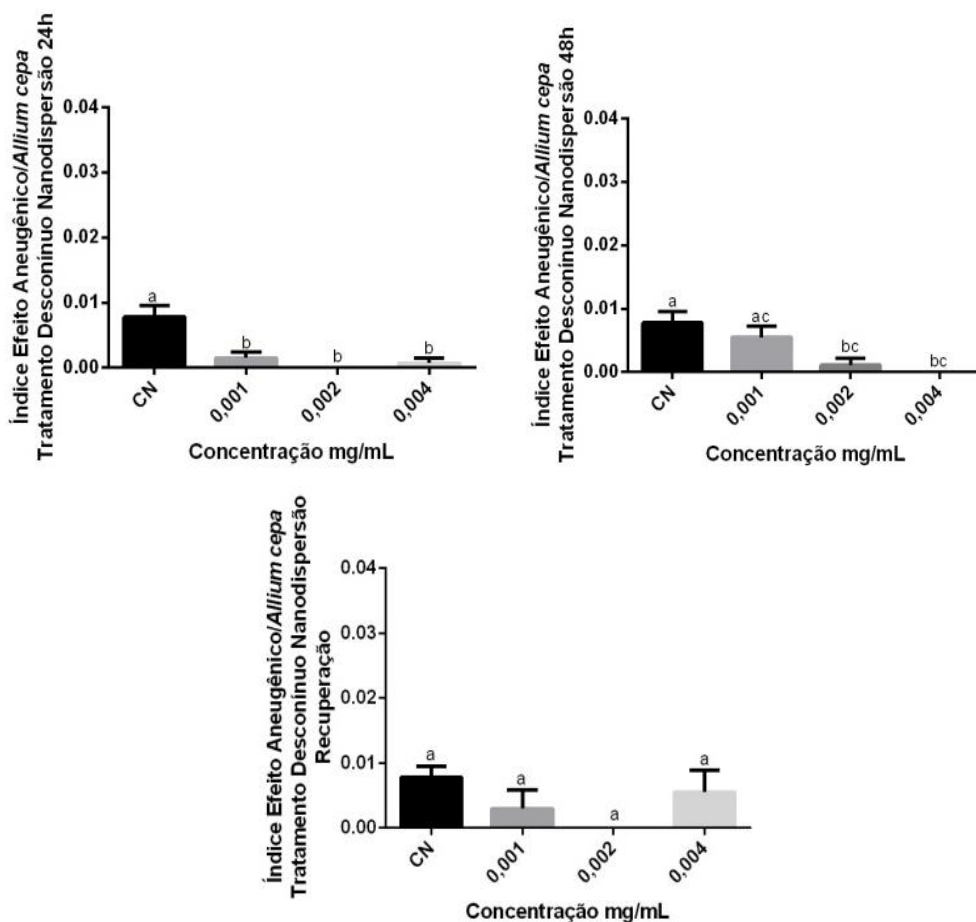


Figura 37: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Cumarina Pura 0,002 mg/mL (CuP).

Quanto aos dados relativos à análise mutagênica, foi possível verificar que as concentrações de 0,002 e 0,004 mg/mL de extrato de guaco apresentaram efeitos clastogênicos significativos (Figura 37), quando comparados ao controle positivo e ao tratamento CuP (Cumarina Pura a 0,002 mg/mL).

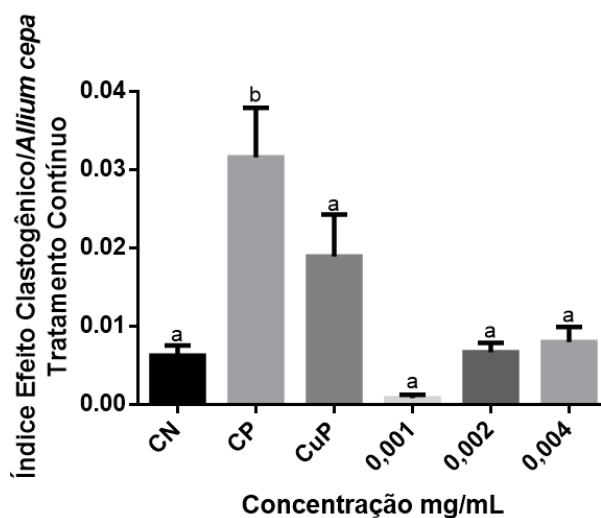


Figura 38: Índice efeito clastogênico. Em sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento contínuo, com controle negativo (CN), controle positivo metilmetanosulfonato - MMS (CP), cumarina pura 0,002 mg/mL (CuP), e três concentrações de cumarina 0,001; 0,002 e 0,004 mg/mL em extrato de etanólico de *Mikania glomerata*.

No tratamento de 24h e 48h (Figura 38), a concentração de 0,001 mg/mL apresentou efeito clastogênico, no entanto, na fase crônica de 48h, é possível verificar que a concentração de 0,004 mg/mL apresentou maior efeito clastogênico, quando comparada ao controle negativo, já na fase de recuperação todas as concentrações se mantiveram estabilizadas não havendo diferença entre elas.

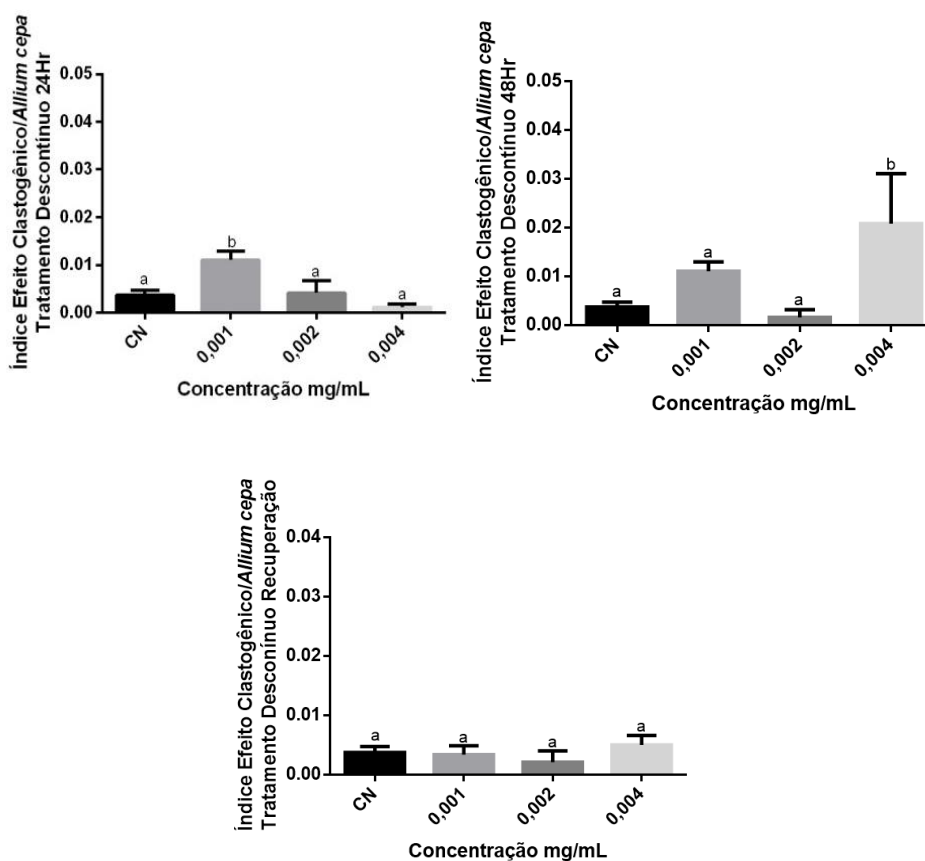


Figura 39: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de cumarina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – mms); Cumarina Pura 0,002mg/mL (CuP).

Os tratamentos descontínuos de nanodispersão não apresentaram nenhum efeito clastogênico, quando comparados ao controle negativo (Figura 39).

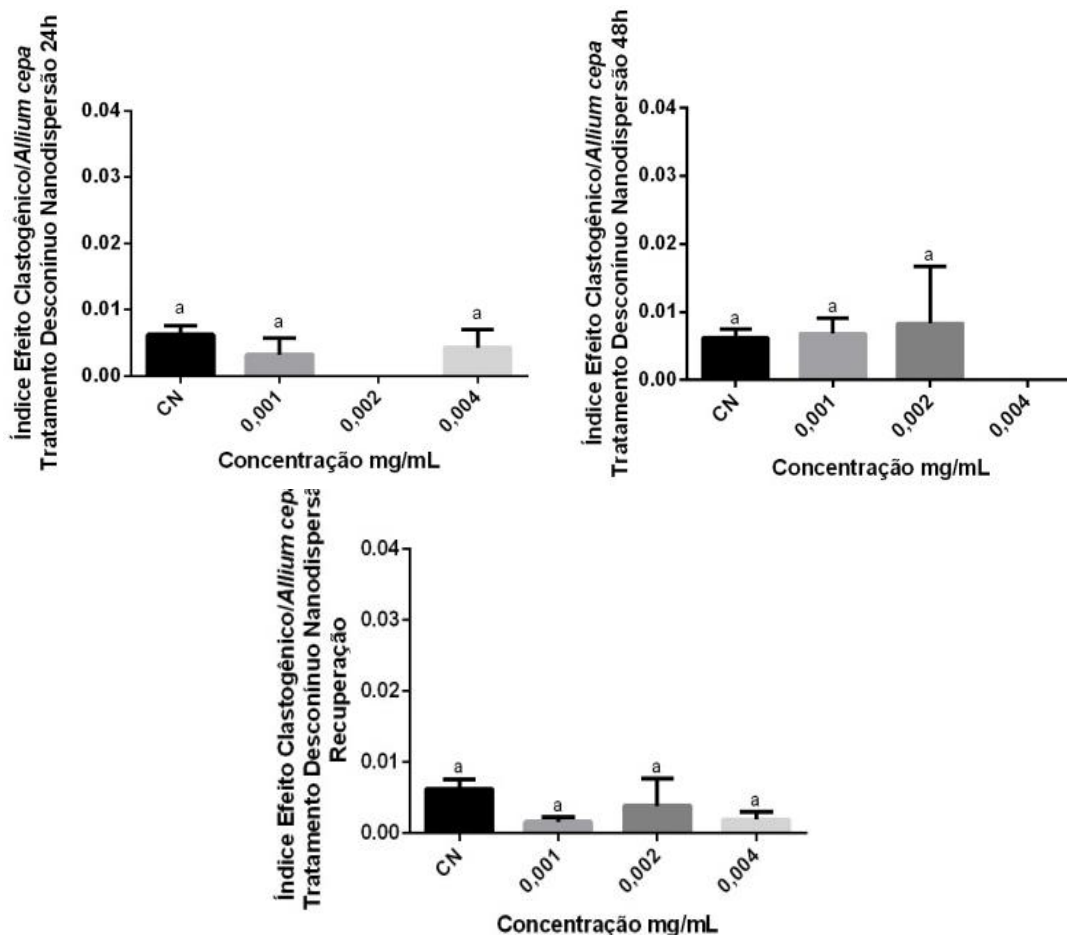


Figura 40: Representação gráfica da Atividade Mutagênica, descontínuo, de três concentrações de curcumina, 0,001; 0,002 e 0,004, em extrato etanólico de guaco (*M. glomerata*) em ensaio de *Allium cepa*. Onde: A) Índice Mitótico. B) Índice Efeito Aneugênico. C) Índice Efeito Clastogênico em sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo. Controle Negativo = CN; Controle Negativo = CN; Controle Positivo (CP metilmetanosulfonato – MMS); Curcumina Pura 0,002mg/mL (CuP).

## 7. DISCUSSÃO DOS DADOS

A concentração de 0,002 mg/mL de cumarina em extrato de guaco provocou um efluxo de  $H^+$  na membrana da raiz de *A. cepa* e, provavelmente, houve um impacto de íons na raiz, o que proporcionou uma despolarização.

A despolarização é uma sinalização que se espalha pela membrana em velocidade alta. Sendo evidente o uso de sinais elétricos, em plantas, para coordenar essa atividade de sinalização, que regulam uma variedade de funções fisiológicas para que haja melhoramento nas respostas adaptativas de plantas. Tal propagação elétrica resulta em assimilação de  $CO_2$  e rendimento no PSII, respiração, consumo de água, trocas gasosas, abertura estomática, absorção de nutrientes, carregamento do floema e expressão gênica (SHABALA et al., 2015).

O aparato bioquímico do vegetal possui finalidade de promover a desintoxicação intracelular, uma vez que as moléculas dos compostos químicos são translocadas para o interior do citoplasma via transporte de membrana. Esse processo é dependente de um gradiente eletroquímico gerado por transportadores primários de  $H^+$  (OGLIARI et al., 2009).

As bombas de prótons são proteínas de membrana, que realizam transporte de íons como  $H^+$  ou  $Ca^{2+}$ , e funcionam a partir da hidrólise de moléculas de ATP, gerando um gradiente eletroquímico de  $H^+$  ao transportar íons contra o gradiente de concentração, efetuando um transporte ativo dos prótons na membrana da célula, fazendo-se o uso de compostos ricos em energia, com o objetivo de manter a homeostase iônica intracelular (importação de solutos, balanço da pressão osmótica de ambos os lados da membrana e manutenção do potencial da membrana celular) (BERTOLAZI, 2013; CATUNDA, 2008).

O transporte ativo de prótons para fora da membrana plasmática gera um gradiente de pH e de potencial elétrico, como visto neste trabalho, que acionam o transporte de muitas substâncias (íons ou solutos), mediante diferentes proteínas de transporte ativo secundário. A atividade da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática é importante para regular o pH citoplasmático e controlar o turgor celular, que por si



coordena os movimentos dos órgãos, a abertura estomática e crescimento celular (Figura 41).

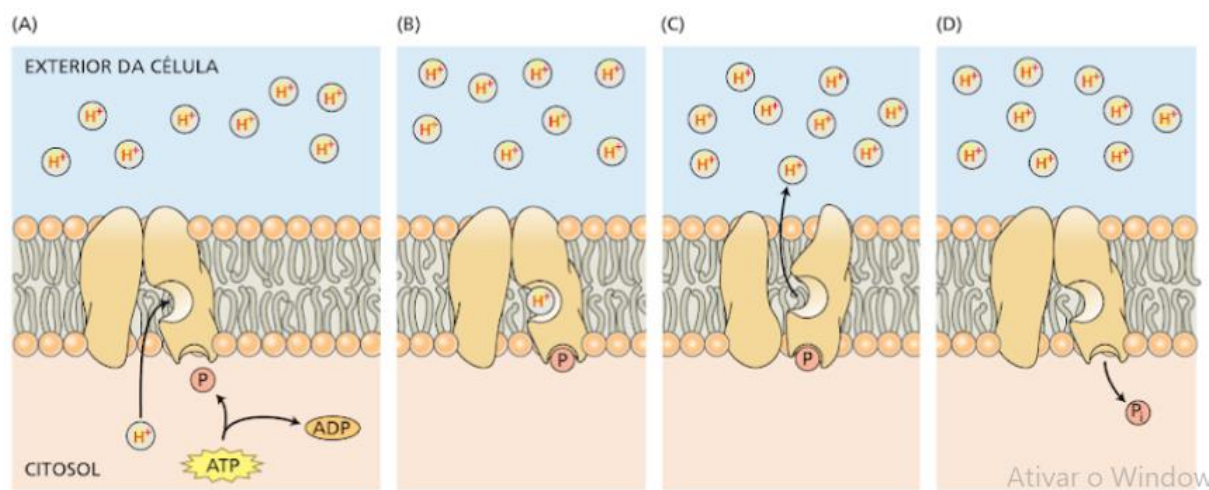


Figura 41: H<sup>+</sup>-ATPase. A bomba inserida na membrana, (A) liga-se ao próton do lado interno da célula e (B) é fosforilada por ATP. (C) Essa fosforilação conduz a uma mudança de conformação que expõe o próton ao exterior da célula e possibilita sua difusão para longe. (D) A liberação do íon fosfato (P<sub>i</sub>) da bomba no citosol restaura a configuração da H<sup>+</sup>-ATPase e permite que comece um novo ciclo de bombeamento (TAIZ et al., 2017).

Para o vegetal distinguir o que não pertence a sua síntese durante a entrada de possíveis patógenos ou solutos, a planta possui mecanismos específicos via padrões moleculares, tais como as proteínas receptoras, RLKs que contêm um domínio extracelular e domínio transmembranares, porém não possuem domínio intracelular da quinase. Esses sinais moleculares de alarme, do vegetal, podem surgir a partir da própria planta, a fim de evitar possíveis danos celulares. Assim, a percepção da superfície basal inibe o crescimento e a atividade de possíveis patógenos (TAIZ et al., 2009).

O efeito de produtos aleloquímicos, em diferentes processos fisiológicos da planta, é dependente das concentrações utilizadas, como visto neste trabalho. Diante dos dados obtidos, observa-se que a *Lactuca sativa* teve comportamento semelhante aos relatados no estudo de Debastiani (2015), em que concentrações de extrato de *Mikania glomerata* proporcionaram inibição da germinação de sementes. Em experimento de Abenavoli e outros (2010) com plântulas de milho cultivadas em hidroponia com exposição de ácido p-cumárico, foi possível observar uma diminuição da atividade H<sup>+</sup>-ATPasica dependente da concentração em resposta aos ácidos p-

cumárico, indicando que a germinação de sementes, absorção de água, capacidade de retenção de eletrólitos e consumo de oxigênio teve uma redução significativa após o tratamento.

Os autores Kupidlowaska e outros (1994) já argumentavam sobre a ação da cumarina dentro do sistema respiratório celular vegetal, uma vez que com esta diminuição da respiração e a fotossíntese existiria uma inibição do transporte de elétrons e, conseqüentemente, a atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo do nitrogênio. Existindo também uma forte correlação entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a recuperação mediada pela cumarina pelo gravitropismo radicular (ANTONIO et al., 2010).

A resistência, ou tolerância de organismos testes em alguns metabólitos, que atuam como aleloquímicos, é quase que específica, existindo espécies mais sensíveis que outras (RABÊLO et al., 2016). Como é o caso da *Lactuca sativa* (alface), que, neste trabalho, apresentou maior sensibilidade e menor resistência à indução do extrato etanólico de *Mikania glomerata*.

Os metabólitos secundários representam um grupo de compostos produzidos pela planta para auxiliá-las na interação com o ambiente, contudo algumas podem ser fitotóxicas e ser provenientes de uma mistura de racêmica e catequina, mecanismo este que a catequina atua como uma fitotoxina desencadeando uma onda de espécies reativas de oxigênio (EROS) iniciado no meristema da raiz, levando a cascata de sinalização por  $Ca^{2+}$ , e assim promove alterações gênicas em nível de genoma (ALMEIRDA, 2015; TAIZ et al., 2009).

Em situações, em que não há germinação da semente, como é o caso deste trabalho, que em concentrações de 0,008 e 0,016 mg/mL, para extrato de guaco, e todas as concentrações de nanodispersão de *Mikania*, pode-se inferir a interferência dos aleloquímicos na cadeia de síntese de glicídios, suprimindo a fonte de carbono durante o processo fisiológico e como conseqüência a não germinação, ocorrendo por meio da redução da atividade enzimática de enzimas ligadas a glicólise e a via oxidativa de pentoses fosfatos, não atingindo níveis suficientes de ATP e esqueletos de carbono para germinação de sementes (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

A falta de carbono influencia no processo de fotorrespiração (Figura 42), que está ligado ao sistema de transporte de elétrons da fotossíntese. Ciclo de Calvin Benson e Ciclo Oxidativo são interligados no sistema de transporte de elétrons justamente porque eles fornecem ATP e alguns redutores como o NADPH para as demais vias (TAIZ et al., 2009).

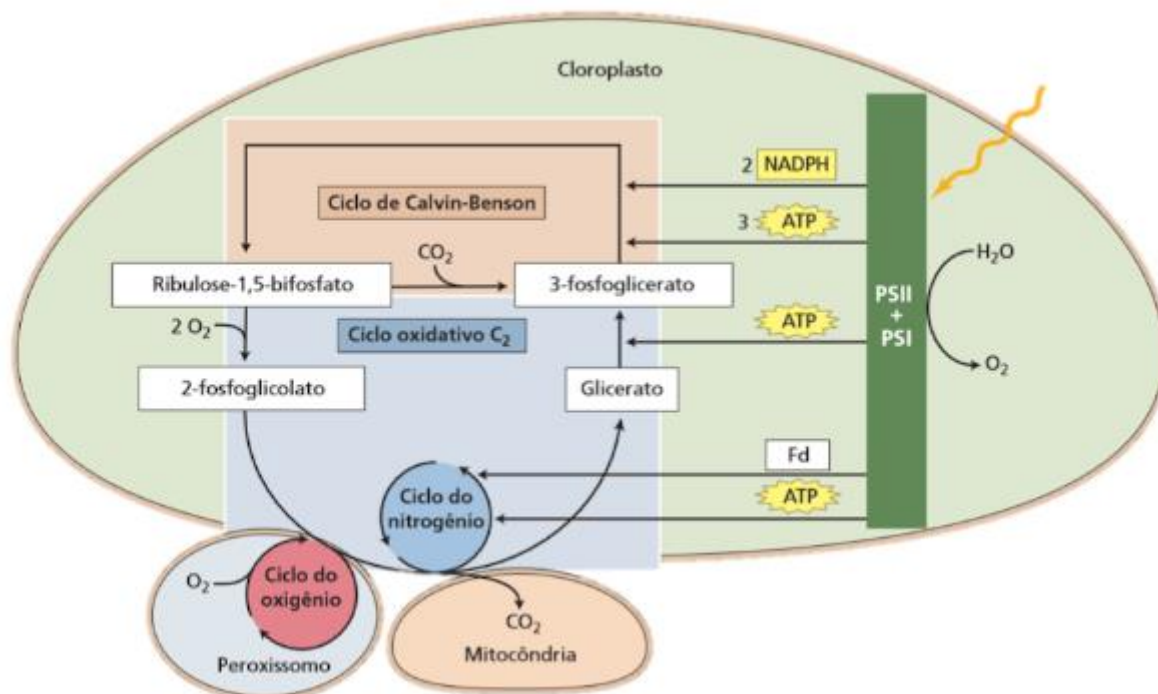


Figura 42: Dependência do ciclo oxidativo fotossintético C<sub>2</sub> do carbono no metabolismo do cloroplasto. Fornecimento de ATP e equivalentes redutores a partir das reações da luz nas membranas tilacóides é necessário para o funcionamento do ciclo oxidativo fotossintético C<sub>2</sub> (TAIZ et al., 2017).

A interferência na germinação também pode ser explicada pela capacidade das plantas de liberarem compostos exsudatos da raiz, em seu ambiente, que podem alterar a química do solo e, conseqüentemente, aumentar a absorção de nutrientes ou protegendo contra toxicidade. Os vegetais também secretam sinais químicos que fazem mediações entre as interações de raízes e bactérias não patogênicas do solo. Alguns destes produtos químicos também participam na comunicação direta entre as plantas, como os metabólitos secundários, os podem inibir raízes de outras plantas (TAIZ et al., 2009), uma vez que a cumarina está relacionada ao crescimento vegetativo da planta, além de outros metabólitos secundários estarem ligados diretamente a fatores genéticos (PEREIRA et al., 2012; TEIXEIRA, 2017).

Quando existe efeito no IVG, isso pode ser um indicativo de que a presença de aleloquímicos nos extratos e nanoemulsão, como a cumarina para este trabalho, inibem a velocidade de desenvolvimento e translocação de componentes nutritivos do endosperma para o embrião (AZAMBUJA et al., 2010).

Os polímeros, como a nanodispersão, envolvem monômeros para obtenção de nanocapsulas e polimerização em emulsão, caracterizando o método de emulsificação-difusão, que podem aumentar a permeação e, assim, aumentar a taxa de liberação do ativo, o que pode explicar o alto índice de alelopatia evidenciado em ambos os organismos testes para este trabalho (PETERS, 2012). A ecologia da cumarinas é multifacetada, uma vez que, quando induzida, pode ocasionar inúmeras respostas a fatores ecofisiológicos, efeitos alelopáticos e impacto fitotóxico e em culturas agrícolas pode apresentar um comportamento inseticida (HUSSAIN et al., 2018).

A quebra da dormência e da semente envolve mudanças do estado metabólico que permite o embrião reiniciar o processo de crescimento, sendo, assim, um processo irreversível e ocasiona a formação da plântula. As plantas desenvolveram mecanismos de percepção (Figura 43) de melhores condições para que a germinação ocorra, como as condições ambientais que funcionam com estímulo para liberação da dormência da semente propiciando uma interação com o ambiente e respostas com múltiplos fatores percebidos simultaneamente ou em sucessão, além da razão de ABA:GA (Ácido Abscísico: Giberelina) que exerce papel crucial na manutenção da dormência das sementes (TAIZ et al., 2009).

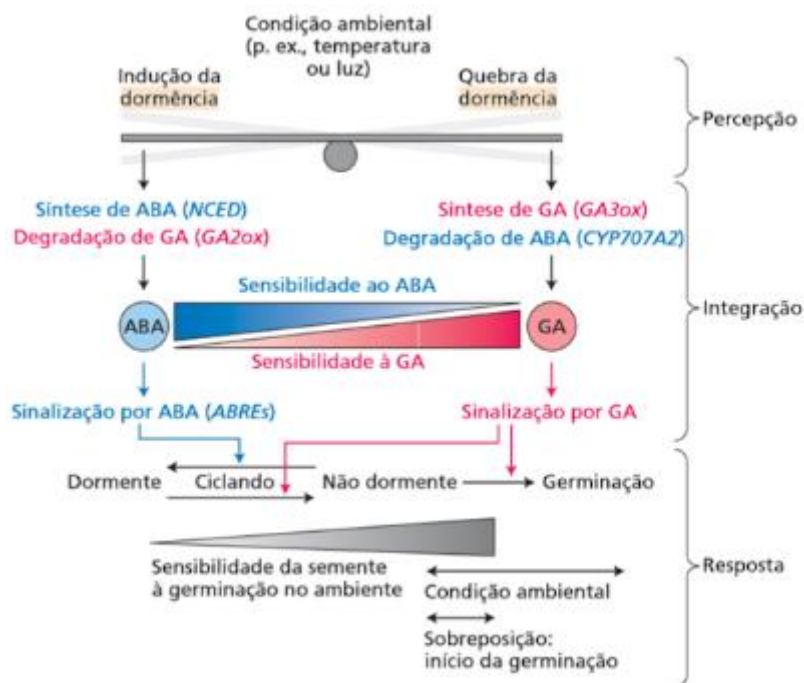


Figura 43: Modelo de regulação do ácido abscísico e giberelina, da dormência e germinação em resposta a fatores ambientais (TAIZ et al., 2017).

Os extratos de plantas, quando associados à nanopartículas, fornecem uma rota Biosintética mais ecologicamente correta o que permite a síntese controlada de seus subprodutos quando utilizados para controlar patógenos tais como fungos, bactérias e vírus na qual a influência destes resulta em grande perda agrícola. Diversos métodos têm sido utilizados para controlar ou reduzir a ação de patógenos, contudo, existem limitações como o uso de pesticidas que causam grande efeito negativo no meio ambiente e na saúde do ser humano (RAJIV et al., 2013). Sendo assim, a biossíntese de nanopartículas é um benefício do uso de vegetais, ou parte deles em organismos patogênicos (VIJAYAKUMAR et al., 2011).

Os efeitos alelopáticos podem ser mediados por substâncias que pertencem aos metabólitos secundários, há uma dificuldade para a identificação do principal responsável pela atividade alelopática e desta maneira a diferença da capacidade alelopática dos extratos e nanodispersão de *Mikania glomerata* Spreng. pode ser explicada pela influência ambiental, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento do vegetal ou com o tipo de cultivo empregado. Efeitos desses compostos em plantas próximas podem reduzir o crescimento de plantas vizinhas,

contudo, a alelopatia possui importância no equilíbrio do ecossistema (BARATTO et al., 2008).

Os usos de nanopartículas têm sido considerados uma alternativa efetiva para controle de patógenos, ecológico, barato e livre de poluentes. A síntese de nanopartículas pode ser obtida por diferença de pH o que ocasiona a enzima oxirredutase ser mais sensível às alterações do pH (RAJIV et al., 2013) e, assim, influenciar no controle de patógenos e conseqüentemente índice de alelopatia, uma vez que, quanto menor o tamanho da partícula, maior sua efetividade como nanopartícula.

Os dados da atividade mutagênica corroboram os resultados obtidos por Dias et al. (2014a), que, ao trabalharem com concentrações diferentes de *Mikania*, observaram uma atividade antiproliferativa, com conseqüente queda do índice mitótico. Em Abenavoli et al., (2010), quando trabalhou com raízes de milho, foi possível observar que a cumarina atrasou a reativação de peroxidases, aumentando a atividade da superóxido dismutase, diminuindo as atividades das enzimas marcadoras de retomada metabólica e reprimiu a transcrição de moléculas chaperonas envolvidos nas vias secretoras. Anteriormente, quando trabalhou com níveis micromolares de cumarina, em cenouras, os autores observaram que houve uma inibição severa do crescimento celular, indicando que a cumarina proporciona ao vegetal alterações metabólicas (ABENAVOLI et al., 2010). O mesmo efeito de inibição do crescimento radicular, em mudas de alfafa, pela cumarina e ácido cumárico foi evidenciado por CHON et al., (2002).

A reatividade da nanodispersão pode estar atribuída ao aumento da área de superfície específica, aumento na energia superficial que conseqüentemente leva ao aumento da reatividade, procedimento de síntese controlado pelo mecanismo de incorporação de nanopartículas nas estruturas de suporte (PRADEEP; BOOTHARAJU, 2009).

A capacidade citotóxica de um extrato ou nanodispersão pode ser determinada pela avaliação do aumento ou diminuição do índice mitótico, uma vez que este índice mede a proporção das células durante a fase da mitose dentro do ciclo celular e o

declive deste índice pode ser interpretado como morte celular ou possível atraso na cinética de proliferação de células (CIAPPINA et al., 2017)

Para que um vegetal possa ser considerado citotóxico, o mesmo deve causar um decréscimo superior a 50% no índice mitótico, sendo, então, chamado de limite citotóxico. Uma possível explicação para os dados do tratamento descontínuo é que as concentrações estudadas do extrato de *Mikania* ocasionam atraso na proliferação ou morte celular, não apresentando células em divisão (CIAPPINA et al., 2017).

Dentro do princípio da embriogênese, a plântula estudada estava no estágio maduro onde o embrião e a semente perde água e tornam-se inativos metabolicamente, uma vez que a germinação se encontra dividida em três partes:

Fase I - as sementes secas absorvem água rapidamente pelo processo de embebição;

Fase II - a absorção de água pela embebição declina e os processos metabólicos são reiniciados;

Fase III - a absorção de água reinicia à medida que a plântula cresce e as reservas de nutrientes são mobilizadas.

Sendo assim, a expressividade da queda do índice mitótico, para este trabalho, pode ser explicada pela fase III da embriogênese, já que, nesta fase, existe um aumento da taxa de absorção de água devido ao afrouxamento da parede celular e à expansão celular, sendo que o potencial hídrico mantido pelo afrouxamento da parede celular e acúmulo de solutos (TAIZ et al., 2009).

Este mecanismo de expansão celular faz com que a plântula absorva mais o soluto disponível e, assim, ocasione interferências no seu ciclo celular, além do aumento da polaridade ao longo do seu desenvolvimento nos dois eixos, apical e radial, como foi visto por Abenavoli et al., (2010), que verificaram a ação de cumarina em dosagens maiores proporcionou efeito de inchaço da ponta da raiz aumentando a superfície disponível para absorção do soluto disponível, argumentando, assim, que a cumarina estimula a absorção líquida e conseqüentemente o principal composto responsável pela inibição do crescimento das raízes bem como possíveis mudanças

histológicas e morfológicas nas raízes. Logo, além de possuírem efeito seletivo em determinados tipos de raízes, quando trabalhadas em baixas concentrações, as interferências induzidas pela cumarina no metabolismo do vegetal estão associadas à distribuição subcelular de auxinas, inibindo a fosforilação fotossintética de maneira dose-dependente (HUSSAIN et al., 2018).

A interação de auxina-cumarina pode envolver o transporte polar da auxina e, segundo o trabalho de Lupini e outros (2010), ao testarem esta característica de forma isolada e com a combinação de cumarina, ficou evidenciado uma interação de grande potencial entre a cumarina e auxina na formação de raízes laterais, indicando que o sistema induzido pela cumarina pode atuar no desenvolvimento de raízes laterais.

Assim, estudos citogenéticos demonstram possíveis alterações cromossômicas nas plantas, devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou provenientes do seu metabolismo, podendo ser detectados pela inibição do ciclo celular, para ambos os tratamentos descontínuos de extrato e nanodispersão com teor de cumarina de *Mikania*, interrupção de metáfases, indução e alterações cromossômicas (VIEIRA; VICENTINI, 1997; BAGATINI et al., 2007).

As alterações clastogênicas podem ser comparadas às encontradas por Dias et al. (2014b), que, ao utilizarem extrato aquoso de *Mikania glomerata*, em concentrações superiores a este trabalho, de  $4\text{g.L}^{-1}$  e  $16\text{g.L}^{-1}$ , perceberam uma capacidade genotóxica, apresentando irregularidades no cromossomo, como pontes anafásicas, quebras cromossômicas, cromossomos perdidos e células binucleadas. Muitos compostos podem ser responsáveis por este efeito clastogênico, uma vez que a *M. glomerata* possui uma grande quantidade de cumarina (1,2-benzopirona), triterpenos, heterosídeos, flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos e polifenóis em sua composição química conforme relatado por Bolina et al., (2009) e Oliveira et al., (1984).

O efeito clastogênico, como formação de micronúcleo, pode ser explicado por quebra do cromossomo ou não segregação dos cromossomos, lesões sem reparo ou reparadas incorretamente, pela ou má função mitótica (LUCIO NETO, 2011). Podem também ser induzidas por estresse oxidativo, apresentando grande número de alterações cromossômicas (DA SILVA et al., 2015). A ocorrência de micronúcleos



está intimamente ligada à resposta da instabilidade do cromossomo, fenótipos e alterações deletérias genéticas, refletindo em alterações cromossômicas para a carcinogênese (STANGE et al., 2009).

As aplicações de nanopartículas são acompanhadas por uma falta de normas de segurança e dados toxicológicos, uma vez que partículas menores podem ocasionar danos maiores do que macro partículas (ASHARANI et al., 2008). Diante disso, ensaios genômicos, a fim de avaliarem a capacidade citotóxica de nanopartículas, evidenciam que essas nanos ecológicas podem não ter efeito sobre a inibição da síntese de DNA, uma vez que o dano em nível de DNA nem sempre é necessário levar a morte do organismo de estudo (ZIA et al., 2018).

Os compostos fitoquímicos, tais como isoflavonas e ácidos orgânicos, possuem propriedade anti-oxidante e, assim, podem ser usados como agentes redutores sintéticos na formulação de nanodispersão. E, dentre os ácidos orgânicos, o ácido gálico e o aldeído *protocatecuico* apresentam maiores características antioxidantes, antibacterianas e anti-mutagênicas (LEE et al., 2013). Este último o que pode explicar a não atividade do efeito aneugênico e clastogênico na condição dos organismos testes vegetais em presença de nanodispersão com teor de cumarina de *Mikania glomerata*.

Contudo, a toxicologia relacionada ao tamanho e à forma de nanopartículas possui elevado debate devido a divergências de resultados de grupos de pesquisa, já que a toxicidade pode ser derivada de agentes redutores e estabilizadores usados para a síntese da nanopartícula, porém muitos pesquisadores acreditam e concentram seus estudos em descobertas de reagente “*eco- friendly*” para a síntese de nanos, bem como produtos naturais que apresentam possíveis agentes não tóxicos, como, por exemplo, vegetais com alta capacidade antioxidantes, antibacterianas e antiinflamatórias (LEE et al., 2013).

As propriedades biocidas de nanoemulsões possuem relevância significativa, proporcionando que propriedades do material estabilizado, tao como as antibacterianas e antifúngicas, podem ser melhor exploradas para controle de pragas e conseqüentemente evitar perda de culturas, porém toda caracterização de uma

nanodispersão não pode conter nenhum efeito contrário ao dos sistemas das plantas (RASKAR; LAWARE, 2014).

Dentro do contexto de biocida, alguns pesquisadores demonstraram que a cumarina exibiu forte atividade inseticida e causou alta porcentagem de mortalidade de ovos e larvas de insetos (SHARMA et al., 2006).

Portanto, de forma geral, as cumarinas naturais ou sintéticas possuem alta capacidade fitotóxicas e seu desempenho em controle de insetos, manejo agrícolas e pragas têm evidenciado resultados promissores, no entanto, pesquisas que estudem mais este modo de ação no mecanismo vegetal e conseqüentemente no impacto biológico são necessários (HUSSAIN et al., 2018).

## 8. CONCLUSÕES

A partir da análise de fluxo de  $H^+$ , pode-se considerar que todos os tratamentos, tanto da nanodispersão, quanto do extrato de *Mikania glomerata* Spreng., promoveram uma inibição do fluxo de íons prótons, em comparação ao controle negativo, sendo que a maior inibição deste fluxo foi determinada pelo extrato etanólico contendo cumarina a 0,002 mg/mL.

A condição inibitória do fluxo de  $H^+$  foi observada em todos os tratamentos (contínuo e descontínuo), com o extrato *Mikania glomerata* que apresentou um padrão e, conseqüentemente, melhor dose de trabalho (0,002 mg/mL). Já para os tratamentos com a nanodispersão o fluxo de  $H^+$ , foi alterado de forma diferenciada, não apresentando um padrão, como ocorreu com o extrato.

Na atividade alelopática, o organismo teste *Lactuca sativa* apresentou maior sensibilidade, quando comparado ao *Allium cepa*. Pode-se, portanto, inferir que este último organismo teste possui melhor resistência para este tipo de análise, principalmente, com o extrato.

Os índices da alelopatia se mostraram com alterações mais expressivas na germinação de *Lactuca sativa*. Sendo que, para a Nanodispersão na atividade alelopática, é possível verificar que ambos os organismos testes foram afetados de forma expressiva, em todos os índices avaliados.

Em relação à atividade mutagênica, os resultados do tratamento contínuo sinalizam que a CuP promove maior efeito clastogênico, indicando que a cumarina isolada promove mais danos à célula vegetal do que quando associada a outros compostos presentes no extrato de guaco. Para o tratamento descontínuo do extrato, é possível verificar que, tanto para a exposição por 24h, 48h, quanto para o tratamento de recuperação, houve uma queda do índice mitótico. No tratamento descontínuo de 24h, a concentração de 0,001mg/mL apresentou efeito clastogênico, quando comparada ao controle negativo.

Desta forma, o presente estudo tem seu caráter do ineditismo reforçado ao desenvolver as análises com este tipo de nanoestrutura juntamente com a avaliação do fluxo de  $H^+$ , sendo necessário salientar a importância de dar continuidade a

trabalhos como este e, possivelmente, aumentar o tempo de análise do fluxo de  $H^+$  até que se obtenha um padrão associado a uma melhor dose de trabalho, para a nanodispersão.

## 9. REFERÊNCIAS

ABENAVOLI, M. R.; LUPINI, A.; OLIVA, S.; SORGONÀ, A. Allelochemical effects on net nitrate uptake and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize seedlings. In: **Biologia plantarum**, v. 54, n. 1, p. 149-153, 2010.

ANESE, S. et al. Phytotoxic activity of different parts of *Drimys brasiliensis* Miq. on germination and seedling development. Atividade fitotóxica de diferentes partes de *Drimys brasiliensis* Miq. na germinação e desenvolvimento de plântulas. In: **Bioscience Journal**, v. 31, n. 3, 2015. ISSN 1981-3163.

ASIF, M. Pharmacological activities and phytochemistry of various plants containing coumarin derivatives. In: **Current Science**, v. 1, n. 3, p. 77-90, 2015.

AUMONDE, T. Z. et al. Desempenho fisiológico e metabolismo antioxidativo de plântulas de arroz-vermelho sob ação do extrato de *Philodendron bipinnatifidum* Schott. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 70, n. 1, p. 47-56, 2015. ISSN 2446-8231.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. D.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. In: **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.

BARATTO, L. et al. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. In: **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 4, p. 577-82, 2008.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. D. E.; DUARTE, M. G. R. Comparative study of the chemical composition of the species *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. In: **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009. ISSN 0102-695X.

BOURGAUD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. In: **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 293-308, 2006. ISSN 1568-7767.

CZELUSNIAK, K. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultze Bip. ex Baker. In: **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DA SILVA, A. E. P.; MIRANDA, J. W.; NETO, M. P. L. Avaliação Tóxica, Citotóxica, Genotóxica e Mutagênica da *Turnera Ulmifolia* L.(Chanana) em Células Eucarióticas/Evaluation Toxicity, Cytotoxic, Genotoxic and Mutagenic Evaluation of *Turnera Ulmifolia* L.(Chanana) in Eukaryotic Cells. In: **Saúde em Foco**, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2015. ISSN 2358-7946.

DEBASTIANI, C. Interferência alelopática na germinação de alface e tomate por derivados de avenca (*Adiantum Capillus-Veneris* L.), Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* R.) e Guaco (*Mikania glomerata* S.). In: **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 1, p. 15-22, 2015. ISSN 1980-0002.

DIAS, M. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania cordifolia* (LF) Willd.(Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. In: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014a. ISSN 1516-0572.

\_\_\_\_\_. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (LF) Willd.(Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. In: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014b. ISSN 1516-0572.

FALHOF, J. et al. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. In: **Molecular plant**, v. 9, n. 3, p. 323-337, 2016. ISSN 1674-2052.

FEIJÓ, J. et al. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. **The Journal of cell biology**, v. 144, n. 3, p. 483-496, 1999. ISSN 0021-9525.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. In: **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. ISSN 1601-5223.

FORNAGUERA, C. et al. PLGA nanoparticles from nano-emulsion templating as imaging agents: Versatile technology to obtain nanoparticles loaded with fluorescent dyes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 201-209, 2016. ISSN 0927-7765.

GAXIOLA, R. A. et al. Plant H<sup>+</sup>-PPases: Reversible Enzymes with Contrasting Functions Dependent on Membrane Environment. **Molecular Plant**, v. 9, n. 3, p. 317-319, 2016. ISSN 1674-2052.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005. ISSN 0137-5881.

HALIMSHAH, S.; WA, W. J.; YUSOFF, N. Allelopathic potential of the leaf and seed of *Pueraria javanica* Benth. On the germination and growth of three selected weed species. **Sains Malaysiana**, v. 45, n. 4, p. 517-521, 2016.

HARUTA, M.; GRAY, W. M.; SUSSMAN, M. R. Regulation of the plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) by phosphorylation. **Current opinion in plant biology**, v. 28, p. 68-75, 2015. ISSN 1369-5266.

HOSSAIN, M.; ANWAR, S.; NANDI, R. Allelopathic effects of Mikania cordata on forest and agricultural crops in Bangladesh. **Journal of forestry research**, v. 27, n. 1, p. 155-159, 2016. ISSN 1007-662X.

JOE, M. M. et al. In vitro antibacterial activity of nanoemulsion formulation on biofilm, AHL production, hydrolytic enzyme activity, and pathogenicity of Pectobacterium carotovorum sub sp. carotovorum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 91, p. 46-55, 2015. ISSN 0885-5765.

KANJANA, D. Potential applications of nanotechnology in major agriculture divisions- A Review. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 699, 2015. ISSN 0974-1712.

LI, Y.-P. et al. Soil microbes alleviate allelopathy of invasive plants. In: **Science Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 1083-1091, 2015. ISSN 2095-9273.

LIANG, C. et al. Response of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in rice (Oryza sativa) seedlings to simulated acid rain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 535-545, 2015. ISSN 0944-1344.

LUCIO NETO, M. **Avaliação Tóxica, Citotóxica, Genotóxica e Mutagênica do Composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2, 4-diona em Células Eucarióticas**. 2011. Master thesis, Universidade Federal do Piauí, Piauí

MACHADO SOUZA, S. A. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2005. ISSN 1519-5228.

MENSAH, E. E. et al. Allelopathic Effect of Topsoil Extract From Tectona grandis L. Plantation on the Germination of Lycopersicum esculentum. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, n. 2, 2015.

MESSIAS, M. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015. ISSN 1516-0572.

MORADI, H.; ELZENGA, T.; LANFERMEIJER, F. Role of the AtCIC genes in regulation of root elongation in Arabidopsis. **Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015. ISSN 2251-9610.

MORALES-CEDILLO, F. et al. Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Plant cell reports**, v. 34, n. 4, p. 617-629, 2015. ISSN 0721-7714.

NEGI, A. et al. Allelopathic Effect of Leaves of Invasive tree *Broussonetia papyrifera* against some crop plants. **Annals of Plant Sciences**, v. 5, n. 01, p. 1261-1264, 2016. ISSN 2287-688X.

NGUYEN, T. T. et al. Potential regulatory phosphorylation sites in a *Medicago truncatula* plasma membrane proton pump implicated during early symbiotic signaling in roots. **FEBS letters**, v. 589, n. 17, p. 2186-2193, 2015. ISSN 1873-3468.

OLIVEIRA, F. D. et al. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.

ORELLANA, S. L. et al. Association Efficiency of Three Ionic Forms of Oxytetracycline to Cationic and Anionic Oil-In-Water Nanoemulsions Analyzed by Diafiltration. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 104, n. 3, p. 1141-1152, 2015. ISSN 1520-6017.

PANATIERI, L. F. et al. Nanoemulsions Containing a Coumarin-Rich Extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the Treatment of Ocular *Acanthamoeba* Keratitis. **AAPS PharmSciTech**, p. 1-8, 2016. ISSN 1530-9932.

PIRES, I. et al. Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 426-433, 2014. ISSN 1516-0572.

RAMOS, A. C.; FAÇANHA, A. R.; FEIJÓ, J. A. Proton (H<sup>+</sup>) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p. 177-188, 2008. ISSN 1469-8137.

RIBEIRO, D. M., DG; OLIVEIRA, LGS; SARAIVA, ME; OLIVEIRA, SF; SOUZA, MMA; MENEZES, IRA. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014. ISSN 1516-0572.



RODRIGUES, A.; ANDRADE, L. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 721-730, 2014. ISSN 1516-0572.

SAHID, I.; TAN, P.; CHUAH, T. Assessment of the potential allelopathic effects of Pennisetum purpureum Schumach. On the germination and growth of Eleusine indica (L.) Gaertn. **Sains Malaysiana**, v. 44, n. 2, p. 269-274, 2015. ISSN 0126-6039.

SALEH, A. M.; MADANY, M. M.; GONZÁLEZ, L. The effect of coumarin application on early growth and some physiological parameters in Faba Bean (*Vicia faba* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 2, p. 233-241, 2015. ISSN 0721-7595.

SINGH, N. et al. Antibacterial action of lipidic nanoemulsions using atomic force microscopy and scanning electron microscopy on *Escherichia coli*. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 10, n. 5, p. 381-391, 2015. ISSN 1745-8080.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Rev. Bras. Farmacog**, v. 19, n. 2B, p. 637-642, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. In: (Ed.). **Fisiologia vegetal**: Artmed, 2009.

VIEIRA, D.; VICENTINI, V. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa*. In: **Genetics Molecular Biology Supplement**, v. 42, 1997.

ZHANG, Y. et al. The allelopathic effect of *Potentilla acaulis* on the changes of plant community in grassland, northern China. In: **Ecological research**, v. 30, n. 1, p. 41-47, 2015. ISSN 0912-3814.