

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

**Atividade biológica do óleo essencial de *Peperomia alata* Ruiz & Pav.
(Piperaceae) em *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor***

ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES

Alegre – ES
2021

ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES

**Atividade biológica do óleo essencial de *Peperomia alata* Ruiz & Pav.
(Piperaceae) em *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Profa. Dra. Milene Miranda
Praça-Fontes

Alegre – ES
2021

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

F363a Fernandes, Alda Francisca Rodrigues de Sousa, 1988-
Atividade biológica do óleo essencial de *Peperomia alata* Ruiz
& Pav. (Piperaceae) em *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor* /
Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes. - 2021.
72 f. : il.

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

1. Fitotoxicidade. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4.
Mutagenicidade. 5. Antimutagenicidade. 6. Micronúcleo. I.
Praça-Fontes, Milene Miranda. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III.
Título.

CDU: 631.523

ALDA FRANCISCA RODRIGUES DE SOUSA FERNANDES

Atividade biológica do óleo essencial de *Peperomia alata* Ruiz & Pav. (Piperaceae) em *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento.

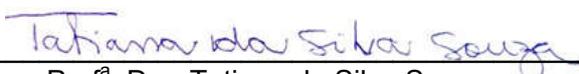
Orientadora: Profa. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes

Aprovada em 23 de fevereiro de 2021.

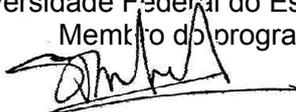
COMISSÃO EXAMINADORA:



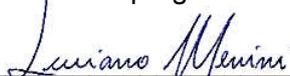
Profa. Dra. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



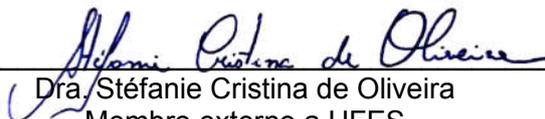
Prof.^a Dra. Tatiana da Silva Souza
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro do programa



Prof.^a Dra. Silvia Tamie Matsumoto
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro do programa



Prof. Dr. Luciano Menini
Instituto Federal do Espírito Santo
Membro Externo a UFES



Dra. Stéfanie Cristina de Oliveira
Membro externo a UFES

*Ao meu esposo Miquéias,
Aos meus filhos Isaac e Rute,
Aos meus pais Joel e Francisca,
Ao meu irmão Renan,
Com muito amor e carinho,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização desse sonho me dando força, fé e sabedoria em cada momento.

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo - FAPES, pelo apoio financeiro.

A prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes, pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência, compreensão, confiança e amizade.

A Jheniffer Abeldt Christ, pela parceria nas coletas do material vegetal em campo. Muito obrigada pela disponibilidade de sempre.

Ao Prof. Dr. Luciano Menini, pelo suporte nas análises químicas realizadas nesse trabalho junto ao laboratório de Fitoquímica e Catálise no Instituto Federal do Espírito Santo - IFES.

Aos membros examinadores, Dra. Milene Miranda Praça Fontes, Dra. Tatiana da Silva Souza, Dra. Sílvia Tamie Matsumoto, Dr. Luciano Menini, Dra. Stéfanie Cristina de Oliveira e Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho, ao compartilharem seus conhecimentos científicos.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, por contribuírem direta ou indiretamente com minha formação profissional e pessoal e pelos conhecimentos compartilhados.

A Sabrina Furtado, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por toda atenção e disponibilidade.

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, que pude conviver e compartilhar muitos momentos de alegria e as vezes de aflição (rsrs, pois fazem parte da pesquisa) e pela convivência harmoniosa.

A Thammyres, Soninha e Quezia pela colaboração com a montagem e execução dos experimentos.

A amiga Marina Santos Carvalho, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade e ótima convivência desde a graduação.

Àqueles que são a base da minha conquista: meus pais Joel Rodrigues de Sousa e Francisca Rodrigues de Santana, pelo amor, confiança, incentivo, investimento e todo suporte na minha vida acadêmica. Ao meu irmão Renan Rodrigues de Sousa, pelos conselhos e estímulo a não desistir. Amo Muito Vocês.

Ao meu esposo Miquéias Fernandes, pelo amor, companheirismo, paciência, incentivo e parceria em cada momento. E aos nossos filhos Isaac e Ruth, pelo amor puro, pelos sorrisos e abraços que me serviram como fonte de energia para não desistir. Minha família, minha base. Amo Muito!!!

Aos meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”.*

Provérbios 16:3

BIOGRAFIA

Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes, nascida em Santa Cruz do Piauí, em 07 de outubro de 1988. Filha de Joel Rodrigues de Sousa e Francisca Rodrigues de Santana, cursou o Ensino Fundamental em Floresta do Piauí na Unidade Escolar Dirceu Mendes Arcoverde até a sétima série. Na oitava série foi transferida para o Instituto Santo Agostinho em Teresina - PI em 2005, onde concluiu o ensino fundamental. Cursou o ensino médio na Escola Técnica Estadual “Gov. Dirceu Mendes Arcoverde”, Teresina - PI. No primeiro semestre de 2009, ingressou no curso de graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Piauí, Campus/Núcleo “Prof. Barros Araújo” em Picos - PI. Durante a graduação, participou de projeto de pesquisa na situação de bolsista (2011-2012) e estagiou no Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Estadual do Piauí, Campus de Teresina - PI e no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, no Departamento de Genética, da Universidade Federal de Pernambuco. Em março de 2013 recebeu o título de Licenciada em Ciências Biológicas e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2015. Em março de 2016 ingressou no curso de Doutorado, atuando na área de Citogenética Vegetal, sob orientação da Prof. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2021.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados (>0,5%) no óleo essencial de <i>Peperomia alata</i>	37
Tabela 2. Índice mitótico e alterações no ciclo celular em células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Peperomia alata</i>	43
Tabela 3. Porcentagem de redução de danos em relação ao micronúcleo em células de <i>L. sativa</i> após exposição ao óleo essencial de <i>P. alata</i> na concentração de 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) associado ao MMS (4×10^{-4} M)	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *P. alata* encontrada no Parque Estadual de Forno Grande, um fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Castelo – Espírito Santo, Brasil (Foto: Jheniffer Abeldt Christ, 2017)15
- Figura 2: Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial de *Peperomia alata*.....38
- Figura 3: Fitotoxicidade do óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm) sobre sementes de *L. sativa*. (A) Índice de germinação (%); (B) Índice de velocidade de germinação (IVG) (%); (C) Crescimento radicular (mm); (D) Crescimento aéreo (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Dunnett ($P>0,05$)39
- Figura 4: Fitotoxicidade do óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm) sobre sementes de *S. bicolor*. (A) Índice de germinação (%); (B) Índice de velocidade de germinação (IVG) (%); (C) Crescimento radicular (mm); (D) Crescimento aéreo (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Dunnett ($P>0,05$)41
- Figura 5: Células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm). (A) interfase normal, (B) metáfase aderente, (C) metáfase com perda cromossômica, (D) c-metáfase, (E) ponte em anáfase e (F) atraso em telófase. Barra: 10 μ m.....44

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 Família e gênero	14
1.2 Óleos essenciais.....	16
1.3 Fitotoxicidade e citotoxicidade.....	17
1.4 Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	19
1.5 Antimutagenicidade.....	21
1.6 Bioensaios vegetais.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24

SCREENING FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Peperomia alata* Ruiz & Pav. (PIPERACEAE) EM BIOENSAIOS VEGETAIS

RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Material vegetal.....	30
2.2 Extração do óleo essencial.....	31
2.3 Análise da composição química do óleo essencial.....	31
2.4 Bioensaios vegetais.....	32
2.4.1 Ensaio de Fitotoxicidade.....	32
2.4.2 Ensaio de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	33
2.5 Análise de Antimutagenicidade.....	34
2.6 Análise Estatística.....	35
3 RESULTADOS.....	36
3.1 Rendimento e composição química do óleo essencial.....	36
3.2 Fitotoxicidade.....	38
3.3 Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	41
3.4 Antimutagenicidade.....	45

4 DISCUSSÃO.....	47
4.1 Rendimento e composição química do óleo essencial.....	47
4.2 Fitotoxicidade.....	49
4.3 Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	51
4.4 Antimutagenicidade.....	53
5 CONCLUSÃO.....	55
6 AGRADECIMENTOS.....	56
7 REFERÊNCIAS.....	56

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Família e gênero

Piperaceae encontra-se dentre as famílias de angiospermas basais mais representativas em número de espécies, representando cerca de 36% de todas as espécies basais (Wanke, 2007; Stevens, 2017). A importância econômica das angiospermas basais é fundamentada principalmente no espectro diversificado de compostos secundários – sobretudo óleos essenciais. Pesquisas demonstram que algumas espécies possuem propriedades analgésica, vasodilatadora, ação oxidante, anticâncer e anti-inflamatória, atividade antimicrobiana e inseticida (Brait et al., 2015; Nordin et al., 2014).

O gênero *Peperomia* foi descrito por Ruiz e Pavon (1794) e destaca-se como o segundo mais biodiverso da família Piperaceae (Melo et al., 2016). As espécies apresentam distribuição pantropical, sendo que 90% ocorrem na flora neotropical, sendo encontradas desde o sul dos Estados Unidos estendendo-se até a Argentina e Chile (Mathieu et al., 2015). Embora a maioria das espécies do gênero seja endêmica das regiões dos Andes e da Amazônia, algumas espécies podem ser encontradas na Ásia, África, Madagascar, Austrália e Nova Zelândia (Wanke et al., 2006; Frenzke et al., 2015; Mathieu, 2001-2020). Por apresentarem folhagens vistosas, muitas espécies são utilizadas como plantas ornamentais (Frenzke et al., 2015) e se caracterizam por serem suculentas, epífitas e geófitas (Gutierrez et al., 2016).

Os metabólitos secundários mais comuns relatados para o gênero são derivados fenólicos prenilados, policetídeos, cromenos, secolignanas, fenilpropanoides, terpenoides, amidas, dímeros de estireno, flavonóides e taninos (Kato e Furlan, 2007; Mbah et al., 2012; Batista et al., 2012; Wang et al., 2012; Verma et al., 2015; Rivera et al., 2015). Os óleos essenciais de algumas espécies também mostraram compostos raros como por exemplo os sesquiterpenos com esqueleto ishwarano raro: o 3-ishwarol e a 3-ishwarona (Lago et al., 2007; Junior et al., 2013).

Um total de 52 policetídeos já foram isolados de espécies de *Peperomia*. Compostos deste tipo foram encontrados em *P. alata*, *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*,

P. glabella var. *nervulosa*, *P. proctorii*, *P. sui*, *P. trineura* e *P. vulcanica*. Entre eles pode-se identificar vários análogos prenilados (Wang et al., 2012; Zhu, 2011). Além dos estudos fitoquímicos, alguns ensaios biológicos foram realizados e efeitos antimicrobianos, citotóxicos, antiinflamatórios, antiparasitários, inseticidas, contra cepas tumorais e herbicidas de extratos e substâncias extraídas de diferentes espécies de *Peperomia* foram relatados (Reigada, 2009; Wang et al., 2012; Gutierrez, et al., 2016).

A espécie *P. alata* é conhecida por apresentar ampla distribuição, encontrando-se em diferentes fitofisionomias. Seu tamanho pode variar entre 18-63 cm e ocorre no Brasil nos Estados do Sudeste, do Sul e no Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Distrito Federal, Goiás e Pará (Flora do Brasil 2020 em construção) (Figura 1).



Figura 1: *P. alata* encontrada no Parque Estadual de Forno Grande, um fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Castelo – Espírito Santo, Brasil (Foto: Jheniffer Abeldt Christ, 2017).

1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de constituintes voláteis, lipofílicos, odoríferos e líquidos. São comumente extraídos de folhas, galhos, flores, frutos ou tecido de casca de plantas superiores. Ainda que todos os órgãos de um vegetal possam conter óleos essenciais, a composição química destes pode variar de acordo com a sua localização. Assim, a composição química de um óleo essencial obtido das flores pode ser diferente daquela obtida dos galhos, ainda que seja proveniente de uma mesma planta (Souza et al., 2009; Sadgrove e Jones, 2015).

A estrutura química dos OEs é composta por elementos básicos como o carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo sua classificação química difícil, tendo em vista serem formados por uma mistura complexa de diversas moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides) e compostos oxigenados como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis, dentre outras substâncias de baixa massa molecular (Simões e Spitzer, 2004; Araújo, 2004). Dentre esses compostos, na maior parte, estão os terpenoides e fenilpropanoides, sendo os primeiros mais frequentes. Os terpenos são geralmente insolúveis em água e derivam da união de unidades de isopreno (cinco átomos de carbono, C5) e são classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Vollhardt e Schore, 2013).

O tamanho da cadeia carbônica está relacionado com a volatilidade dos terpenos. Os monoterpenos são muito voláteis, os sesquiterpenos exibem média volatilidade e os diterpenos quase não apresentam volatilidade (Almeida et al., 2015). Os monoterpenos geralmente formam os principais constituintes em OEs, com grande importância para a indústria de perfumes e fragrâncias, além de agirem como herbicidas, pesticidas, antimicrobianos e anticarcinogênicos em alimentos (Sousa, 2011). São biodegradáveis e por isso são utilizados também no controle de pragas (Sousa, 2011). Os fenilpropanoides são um grande grupo de compostos orgânicos produzidos pelas plantas para proteção contra infecções, irradiação ultravioleta, ferimentos e herbívoros. Sua formação ocorre a partir da via do ácido chiquímico, dando origem a fenilalanina. Com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) se forma o ácido cinâmico, que por meio de reduções

enzimáticas formam os alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanoides (Baser e Buchbauer, 2012; Silva et al., 2014).

Os OEs são provenientes dos metabolitos secundários e exercem funções importantes nas plantas contra patógenos e herbívoros, além de, colaborarem para a atração dos polinizadores e disseminadores de sementes (Dudareva et al., 2013; Mahdieh et al., 2018). Muitos óleos essenciais e seus constituintes revelam também bioatividades e têm por isso aplicação na saúde humana e animal, desde atividade antimicrobiana, antiespasmódica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antioxidante, biocida e até anticancerígena (Bakkali *et al.*, 2008; Zuzarte *et al.*, 2011). Com isso, podem apresentar grandes possibilidades de uso em indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica (Bizzo, 2009).

Estudos utilizando óleos essenciais têm demonstrado o potencial destes compostos no que diz respeito às suas funções biológicas (Jing et al., 2018). A grande variedade dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas tem despertado o interesse de pesquisadores de diversos campos da ciência, pois estes representam uma grande fonte para adquirir novas moléculas potencialmente úteis ao ser humano (Costa, 2016).

1.3 Fitotoxicidade e citotoxicidade

Fitotoxicidade é uma reação tóxica que determinada substância química pode provocar nas plantas (Palmieri 2012). Algumas plantas conseguem disponibilizar compostos aleloquímicos que ficam armazenados nos seus diferentes órgãos, os quais podem ser liberados no ambiente e, nesse caso, prejudicar funções importantes para um bom desenvolvimento de outras. Estas funções estão ligadas às atividades biológicas, desde a germinação, crescimento e atividade fotossintética (Oliveira et al., 2014). Geralmente os sintomas de fitotoxicidade apresentados pelas plantas, decorrente da ação de aleloquímicos, consistem na inibição parcial ou total da germinação de sementes, danos no sistema radicular, desorganização no mecanismo de absorção, clorose e necrose foliar, podendo levar até a morte da planta (Gatti et al., 2010; Silvestre et al., 2013).

A ação desses compostos pode ser direta, pela indução de alterações celulares e metabólicas, ou indireta, promovendo alterações sobre os organismos que habitam o solo e têm efeito sobre propriedades e características nutricionais de outras plantas (Reigosa et al., 1999). A ação fitotóxica destes compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são consequências secundárias de efeitos ocorridos anteriormente a nível molecular e celular, provocando distúrbios celulares generalizados e que agem em diversos locais de interferência (Ferreira e Áquila, 2000; Narwal e Sampietro, 2009).

A avaliação fitotóxica permite determinar se a substância em estudo é capaz de inibir a germinação das sementes, o desenvolvimento das plantas e o crescimento das raízes, que por sua vez, tem o primeiro contato com a substância testada e, conseqüentemente, são as primeiras a apresentar os efeitos causados (Aslam et al., 2007; Jorge, 2018). Nos testes de toxicidade, os organismos modelos são expostos a diferentes concentrações da substância-teste e os efeitos tóxicos provocados são observados e quantificados, com o objetivo de averiguar a ação de agentes físicos, químicos e biológicos a diferentes organismos, avaliando o potencial de risco à saúde humana e ao ambiente (Ribo, 1997; Arraes e Longhin, 2012). Os testes de fitotoxicidade são simples, confiáveis, rápidos e baratos (Valerio et al., 2007), além de serem efetivos na averiguação de toxicidade de substâncias inorgânicas e orgânicas. A variável mais integrativa analisada nesse teste é o crescimento radicular, pois a redução desse parâmetro pode resultar de vários mecanismos isolados ou em conjunto, como inibição da absorção de nutrientes, inibição do alongamento celular, morte celular e inibição da divisão celular (Freitas et al., 2016).

Análises microscópicas têm sido realizadas em conjunto com os ensaios de fitotoxicidade, contribuindo para a elucidação dos mecanismos de atuação de óleos essenciais e extratos no ciclo celular de plantas-teste (Carvalho et al., 2019; Santos et al., 2019; Vasconcelos et al., 2019). A citotoxicidade corresponde as propriedades nocivas de uma substância em relação às células (Galter, 2020). O índice mitótico indica a proliferação adequada das células e conforme Becavello et al. (2012) é utilizado como parâmetro para análise da citotoxicidade e, pode ser avaliado por meio do teste em modelos vegetais (Tedesco et al., 2012). A redução e o aumento do IM indicam uma perturbação na divisão celular, o bloqueio do início da prófase e,

consequentemente, o impedimento da divisão e proliferação celular (Andrade et al., 2010; Grippa et al., 2010).

Assim, os testes de citotoxicidade quando realizados conjuntamente aos testes de fitotoxicidade, possibilitam ampla exploração e elucidação dos resultados observados, além do esclarecimento do modo de ação de determinado composto (Andrade et al., 2010; Young et al., 2012; Aragão et al., 2015).

1.4 Genotoxicidade e mutagenicidade

O DNA é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a sequência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (Lewin, 2001). Por apresentar essa função fundamental, o DNA é bastante protegido, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (Lehninger *et al.*, 1995). Entretanto, ainda assim está sujeito a mutações que, segundo Zaha (1996), são alterações súbitas no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Estas alterações, segundo Lewin (2001) podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devido à exposição do organismo a agentes químicos, físicos ou biológicos (mutações induzidas).

Os compostos mutagênicos podem induzir alterações genômicas visando diretamente e/ ou indiretamente o DNA, por meio da ligação às proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (Mateuca *et al.*, 2006). Estima-se que a média da frequência de mutações espontâneas por pares de bases em células humanas seja de 10^{-8} a 10^{-10} , sendo que essa frequência pode aumentar de 1 a 10 vezes quando há exposição a um agente mutagênico (Ajith et al., 2006).

O teste de alterações cromossômicas permite estimar o potencial genotóxico das substâncias testes. Além de elucidar os mecanismos de ação que resultam nas alterações no ciclo celular, ou seja, aneugênico e/ou clastogênico (Leme et al., 2008). Clastógenos provocam alterações na estrutura cromossômica gerando a perda das características normais de condensação ou alterar a sequência de DNA do indivíduo, sendo ambas passíveis de determinar a morte celular (Fernandes et

al., 2009; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016). A ação aneugênica promove injúrias no fuso mitótico, sendo nociva às células, afetando a segregação simétrica dos cromossomos/cromátides na divisão celular, podendo resultar na segregação cromossômica anormal, determinando no desequilíbrio genômico das células filhas (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016).

Esses mecanismos de ação podem ser avaliados a partir das alterações cromossômicas observadas. De modo que, alterações cromossômicas como poliploidização, C-metáfase, perdas cromossômicas e anáfase multipolar podem estar relacionadas com problemas na polimerização e despolimerização das fibras do fuso mitótico, sendo dessa forma caracterizadas como alterações indicadoras de ação aneugênica. Esse tipo de dano pode acarretar uma segregação assimétrica, conduzindo a anormalidades quando as células filhas são formadas (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015).

Outro dano que pode ser analisado é a aderência cromossômica, que é decorrente de alterações citológicas, genéticas e epigenéticas (Freitas et al., 2016; Silveira et al., 2017). Essa alteração é um tipo de anormalidade nas proteínas histônicas da cromatina e não o próprio DNA, sendo irreversível e considerada um indicativo de ação aneugênica e/ou clastogênica, geralmente determina a morte celular (Fernandes et al., 2009; Freitas et al., 2016). A aderência cromossômica pode desencadear outras alterações como pontes e micronúcleos, já que os cromossomos tendem a permanecer juntos e, quando separados, sofrem rupturas cromossômicas (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016). Os micronúcleos podem surgir espontaneamente na célula, porém, sua indução é utilizada para identificar danos genéticos oriundos da exposição à uma substância mutagênica. Desse modo, a presença de micronúcleos, tem sido interpretada como indicadora de ação clastogênica e aneugênica (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015).

Assim, a genotoxicidade permite avaliar efeitos de exposição do material genético a um determinado agente que resulta em manifestações de alterações cromossômicas as quais possibilitam reparo, sendo elas: troca entre cromátides irmãs - quando há troca de segmentos entre os filamentos eucarióticos replicados na mitose; formação de adutos de DNA - onde compostos carcinogênicos se ligam ao DNA; síntese de DNA não programada - quando a síntese do DNA ocorre

independente da duplicação cromossômica; lesões no DNA - quando danos que induzem desvios em relação a conformação normal do DNA e que se não reparados podem resultar em mutações (Santos, 2015; Figueira, 2017). Porventura, se a lesão genotóxica for fixada, concedendo alterações hereditárias - também chamadas de mutações, capazes de perenizar nas células filhas durante a replicação - o agente apresenta potencial mutagênico (Krüger, 2009; Costa et al., 2014).

Resumidamente, mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo (Dearfield et al., 2002). Desse modo, a mutagenicidade verifica se o agente pode causar alteração nuclear permanente no conteúdo ou estrutura do material genético, sendo elas: substituição de pares de bases, alterações na matriz de leitura - ocorrendo por adição ou deleção de nucleotídeos - alterações no número de cromossomos e alterações na estrutura dos cromossomos. Ainda que ocorram mutações espontâneas, a maioria é instigada por agentes físicos, químicos e biológicos, aos quais podemos ser expostos constantemente (Costa et al., 2014). Muitas vezes, a genotoxicidade é confundida com a mutagenicidade. Todas as substâncias mutagênicas são genotóxicas, no entanto, nem todas as substâncias genotóxicas são mutagênicas (De Flora e Izzotti, 2007). As genotoxinas podem ser classificadas de acordo com os seus efeitos em: 1) Carcinogênicas ou agentes causadores de câncer; 2) Mutagênicas ou agentes causadores de mutação e; 3) Teratogênicas ou agentes causadores de defeitos congênitos (Natarajan, 1993).

1.5 Antimutagenicidade

A antimutagenicidade é o processo pelo qual há redução da frequência da mutação espontânea ou induzida. Os testes de antimutagenicidade verificam se o agente é capaz de reduzir a taxa de mutação, assim, os agentes antimutagênicos atuam como protetores da molécula de DNA, prevenindo os organismos contra a indução de danos genéticos e de doenças relacionadas a alterações promovidas nas células (Gheller et al., 2017).

Os agentes antimutagênicos podem ser classificados em duas categorias: aqueles que inibem a formação de lesões e são classificados como desmutagênicos,

e aqueles que colaboram no reparo das lesões que já estão presentes no DNA, denominados bioantimutagênicos (Liviero et al., 1996). O processo de desmutagênese ocorre de forma extracelular, onde o agente atua como protetor, expressando sua capacidade de inativar um agente mutagênico por meio da atuação direta sobre a substância indutora de mutações genéticas; assim inativa de forma química, física ou enzimática, bloqueando ou modificando mutágenos antes que ocorra a ligação com o DNA. A inativação química ou física pode ocorrer por meio da ligação direta com o mutágeno, já a inativação enzimática ocorre impedindo a ativação do metabolismo de mutágenos. Nas inativações químicas ou físicas pode ocorrer também o sequestro de radicais livres, impedindo sua ligação ao DNA, o que dá ao agente a capacidade antioxidante. Já na ação bioantimutagênica que ocorre em nível celular, os agentes são capazes de modular o reparo e a replicação do DNA, inibindo os possíveis erros do sistema de reparo ou estimulando o reparo livre de erros, participando da supressão das mutações genéticas após a sucessão dos danos ao DNA, o que conseqüentemente aumenta a fidelidade da replicação do material genético (Carneiro, 2016; Oliveira, 2016; Gheller et al., 2017).

Os modelos vegetais são eficazes em estudos sobre o potencial antimutagênico de produtos naturais, sendo capazes de gerar dados valiosos, permitindo avaliar os mecanismos de ação dessas substâncias. Portanto, os modelos de plantas constituem uma alternativa válida, econômica e fácil de manusear aos modelos de animais para esse fim (Andrade-Vieira et al., 2017).

1.6 Bioensaios vegetais

Os bioensaios tem sido utilizado em pesquisas relacionadas a avaliação da resposta biológica a uma determinada substância ou metabólito, permitindo assim a detecção de compostos bioativos (Pires e Oliveira, 2011; Aragão et al., 2015). Estes ensaios fornecem informações importantes sobre o efeito dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais ou extratos do material a ser estudado sobre a divisão celular, germinação e crescimento da raiz (Reigosa *et al.* 2013).

Os vegetais superiores como a *Lactuca sativa* (alface - eudicotiledônea) e *Sorghum bicolor* (sorgo - monocotiledônea), têm se mostrado sensíveis a

substâncias tóxicas, possibilitando a identificação dos níveis de toxicidade de diferentes concentrações de compostos isolados, bem como, de efeitos sinérgicos entre moléculas (Reigosa et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Outro benefício da utilização de plantas superiores como organismos teste é a possibilidade de avaliar diferentes variáveis simultaneamente, como: fitotoxicidade (porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e aéreo); citotoxicidade (alteração na proporção das fases do ciclo celular, alteração do índice mitótico); genotoxicidade (alterações cromossômicas estruturais e numéricas); mutagenicidade (células com micronúcleo); isso devido à taxa de proliferação e germinação, e por seus grandes cromossomos que favorecem as análises citogenéticas (Pinheiro et al., 2015; Silveira et al., 2017; Aragão et al., 2017; Alves et al., 2018).

Por todas essas vantagens, as agências de proteção ambiental e padronizações de bioensaios recomendam a utilização de plantas superiores como organismos modelo para a determinação dos efeitos de substâncias tóxicas (US EPA, 2012; Silveira et al., 2017; Andrade-Vieira et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a composição química e avaliar a atividade biológica do óleo essencial extraído de folhas de *Peperomia alata* por meio dos modelos vegetais *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica do óleo essencial de *P. alata*.
- Avaliar o efeito fitotóxico do óleo essencial nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) no desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*.
- Identificar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico do óleo essencial nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em *Lactuca sativa*.
- Investigar a atividade antimutagênica do óleo essencial na concentração de 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em *Lactuca sativa*.

SCREENING FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Peperomia alata* Ruiz & Pav. (PIPERACEAE) EM BIOENSAIOS VEGETAIS

Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes¹, Jheniffer Abeldt Christ², Miquéias Fernandes³, Luciano Menini⁴, Tatiana Tavares Carrijo^{1,5}, Milene Miranda Praça Fontes^{1,5*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

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

³Programa de Pós-graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brasil.

⁴Laboratório de Química Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). Rua Principal, s/n, Distrito de Rive, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

⁵Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

RESUMO

O gênero *Peperomia* se destaca pela produção de óleos essenciais, e ocupa a segunda posição como fonte de compostos bioativos dentro da família Piperaceae. Estudos utilizando óleos essenciais têm demonstrado o potencial destes compostos no que diz respeito às suas funções biológicas, que podem ser usados como fontes alternativas à base de produtos naturais. Diferentes espécies do gênero *Peperomia* possuem várias atividades relatadas, inclusive *P. alata* que já foi indicada como planta medicinal. Os testes realizados com bioensaios vegetais permitem a avaliação da atividade biológica e identificação de compostos bioativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um *screening* fitoquímico do óleo essencial de folhas de *P. alata* e avaliar o potencial fitotóxico, via os bioensaios vegetais com

Lactuca sativa e *Sorghum bicolor*, e os potenciais citotóxico, genotóxico, mutagênico e antimutagênico via células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Para isso, o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e seus constituintes químicos foram analisados por meio da cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e de espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos majoritários presentes no óleo essencial foram: miristicina (37,87%), *gama*-cadineno (28,13%), safrol (16,37%) e *o*-metileugenol (9,74%). Concentrações do óleo essencial de *P. alata* inibiram de forma gradual a germinação e os crescimentos radicular e aéreo nos dois modelos teste. Dentre os tratamentos que permitiram a germinação de sementes, observou-se que houve resposta citotóxica nas concentrações de 750 e 187,5 ppm e dano genotóxico na concentração de 1500 ppm. Na análise antimutagênica, foi notada redução significativa de danos causados pelo agente MMS, demonstrando potencial antimutagênico, sendo que os resultados indicam que o óleo essencial de *P. alata* na concentração de 187,5 ppm pode inativar o agente mutagênico (desmutagênese) ou modular a replicação e o reparo do DNA (bioantimutagênese). Diante disso, os efeitos observados apoiam seu potencial fitotóxico em eudicotiledôneas e monocotiledôneas e atividade antimutagênica em células meristemáticas de *L. sativa*. Esses resultados sugerem que o óleo essencial de *P. alata* pode ser utilizado como alternativa de novos compostos bioativos, no desenvolvimento de bioherbicidas e fármacos.

Palavras-chave: Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, antimutagenicidade, micronúcleo.

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Peperomia alata* Ruiz & Pav. (PIPERACEAE) IN PLANT BIOASSAYS

ABSTRACT

The genus *Peperomia* stands out for the production of essential oils, and occupies the second position as a source of bioactive compounds in the Piperaceae family. Researches using essential oils have demonstrated the potential of these compounds regarding to their biological functions, which can be used as alternative sources based on natural products. Different species of the genus *Peperomia* have several reported activities, including *P. alata*, which has already been indicated as a medicinal plant. The tests carried out with plant bioassays allow the assessment of biological activity and identification of bioactive compounds. Thus, this research aimed to perform a phytochemical screening of the essential oil of *P. alata* leaves and to evaluate the phytotoxic potential, through the plant bioassays with *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*, and the cytotoxic, genotoxic, mutagenic and antimutagenic potentials by meristematic cells of *Lactuca sativa*. The essential oil was obtained by hydrodistillation and its chemical constituents were analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (CG-DIC) and mass spectrometry (CG-EM). The major compounds present in the essential oil were: myristicin (37.87%), gamma-cadinene (28.13%), safrole (16.37%) and o-methyleugenol (9.74%). Concentrations of the essential oil of *P. alata* gradually inhibited germination and root and aerial growth in the two test models. Among the treatments that allowed seed germination, it was observed that there was a cytotoxic response in the concentrations of 750 and 187.5 ppm and genotoxic damage in the concentration of 1500 ppm. In the antimutagenic analysis, a significant reduction in damage caused by the MMS agent was noticed, demonstrating antimutagenic potential, and the results indicate that the essential oil of *P. alata* at a concentration of 187.5 ppm can inactivate the mutagenic agent (desmutagenesis) or modulate the DNA replication and repair (bioantimutagenesis). Therefore, the observed effects support its phytotoxic potential in eudicotyledons and monocotyledons and antimutagenic activity in meristematic cells of *L. sativa*. These results suggest that the essential oil

of *P. alata* can be used as an alternative to new bioactive compounds, in development of bioherbicides and drugs.

Keywords: Phytotoxicity, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, antimutagenicity, micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

A família Piperaceae é uma das maiores dentre as angiospermas basais, com cerca de 36% do total de espécies, e se destaca, como produtora de metabólitos secundários com atividades biológicas confirmadas (Cria, 2016; Stevens, 2017). *Peperomia* Ruiz & Pávon é o segundo maior gênero da família, com aproximadamente 1500 espécies (Mathieu, 2001-2020). A família Piperaceae conhecida devido a sua importância econômica, biológica e ecológica devido à diversidade de metabólitos secundários biologicamente ativos como terpenos, pironas, lactonas, cromenos, chalconas, lignóides, amidas e alcalóides isolados dos diversos tecidos de suas espécies (Kato e Furlan, 2007). Quimicamente, é conhecida pela produção de mais de 700 substâncias químicas (Batista et al., 2011).

Várias espécies de *Peperomia* são cultivadas como plantas ornamentais devido ao hábito herbáceo, filotaxia e principalmente pela beleza de suas folhas com diferentes formas e cores, dentre elas: *P. caperata* Yunck., *P. serpens* (Sw.) Loudon e *P. obtusifolia* (L.) A. Dietr. (Lorenzi & Souza, 2008; Pinheiro, 2011; Frenzke et al., 2015). Além disso, algumas espécies também são usadas na culinária, como *P. pellucida* (L.) Kunth e na medicina popular como *P. tetraphylla* (G. Forst.) Hook. & Arn., *P. glabella* (Sw.) A. Dietr. e *P. alata* Ruiz & Pav. (Monteiro e Guimarães, 2008; Pinheiro, 2011). O gênero também se destaca pela produção de óleos essenciais (OEs) com compostos biologicamente ativos (Silva et al., 1999; Gutierrez, 2016).

Em relação aos estudos fitoquímicos, é considerado a segunda maior fonte de compostos bioativos dentro da família, representando 15% do total destas substâncias (Lopez et al., 2010) e são caracterizadas pelos seus óleos essenciais de natureza terpênica e pela presença de fenilpropanóides (Mora, et al., 2016; Pinheiro, et al., 2011). Diferentes estudos sobre as propriedades químicas demonstraram a presença de atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, herbicida e antitumoral de diversas espécies do gênero (Mahiou et al., 1995; Li et al., 2007; Felipe et al., 2008; Velozo et al., 2009; Pinheiro et al., 2011; Mbah et al., 2012; Yang et al., 2014; Jardim et al., 2016; Rivera, et al., 2015; Mora, et al., 2016; Gutierrez, 2016; Alves et al., 2019). O extrato bruto da espécie *P. alata*, por exemplo, apresentou forte atividade fungicida contra *Cladosporium cladosporoides* e *C. sphaerospermum* (Reigada, 2009).

Os OEs possuem várias aplicações nas indústrias, como por exemplo, farmacêuticas, cosméticas, agricultura no combate a pragas e doenças agrícolas, entre outras. Neste sentido, pesquisas com OEs têm como finalidade, investigar e desvendar seus mecanismos de ação que confere uma específica atividade biológica e com isto desenvolver fontes alternativas à base de produtos naturais (Butler, 2008; Estevam et al., 2016). Para que o uso dos compostos naturais seja realmente seguro são necessários testes toxicológicos para comprovação da sua eficácia (Figueredo et al., 2014; Nascimento et al., 2018). Para monitorar a bioatividade de extratos, óleos essenciais e compostos isolados de plantas e a identificação de substâncias tóxicas, bioensaios utilizando espécies vegetais como organismos alvos podem ser aplicados (Pinheiro et al., 2015; Aragão et al., 2017; Alves et al., 2018).

Após a exposição à substância por determinado tempo podem ser avaliados tanto os efeitos fitotóxico por meio da redução do crescimento das raízes, além de citotóxicos por meio da alteração do índice mitótico (Krüger, 2009; Galter, 2020); ainda podem ser observados os efeitos mutagênicos pela formação de micronúcleos e antimutagênicos (Bagatini et al., 2007; Filho et al., 2019).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo determinar a composição química e avaliar a atividade biológica do óleo essencial extraído de folhas de *Peperomia alata* por meio dos modelos vegetais *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a extração do óleo essencial, as amostras vegetais (folhas) de *P. alata* foram coletadas no Parque Estadual do Forno Grande, localizado no município de Castelo no estado do Espírito Santo, Brasil (Voucher JACrist 242). O parque fica situado na latitude sul (20°32'29"), longitude oeste (41°07'17") e possui relevo montanhoso com variação altimétrica de 1.600 a 2.039 metros. A coleta foi realizada no mês de março no período da manhã.

Para os ensaios biológicos, foram utilizadas sementes comerciais de *Lactuca sativa* (variedade Crespa Mônica 31 - marca Feltrin), e de *Sorghum bicolor* (Cultivar: IAC Santa Elisa).

2.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo foi realizada no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alegre, ES.

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, em aparelho do tipo Clevenger, seguindo metodologia adaptada de Souza et al., (2017). Foram utilizadas cerca de 260 g de folhas frescas em aproximadamente 1 L de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2 L. O hidrolato obtido foi centrifugado promovendo a separação entre as fases aquosa e oleosa. O óleo essencial (sobrenadante) foi retirado e armazenado em frasco âmbar em freezer (Pinheiro et al., 2015, Mendes et al., 2018).

2.3 Análise da composição química do óleo essencial

A análise de composição química do óleo foi realizada no laboratório de Fitoquímica e Catálise no Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) (aparelho Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) (aparelho Shimadzu QP2010- Plus) seguindo a metodologia adaptada de dos Santos et. al., (2021). Sendo empregadas em ambas as análises as seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária Rtx®-5MS (0,25 µm de espessura do filme); N₂ (em análise de GC/FID) e He (em análises de CG/MS) como gás de arraste com fluxo de 3,0 mL/min; a temperatura do forno seguiu uma programação em que permaneceu por 3 minutos a uma temperatura inicial de 40 °C e em seguida foi aumentando gradativamente

3°C/minuto até atingir 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura do detector de 280 °C; razão de split de 1:30. As análises por GC/MS foram realizadas em um equipamento operando por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/segundo e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z).

Foi analisado um volume de 1 µL de uma solução de 2% (v/v) ou µg/mL da amostra de óleo essencial dissolvido em álcool etílico absoluto. A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção (IR) tabelados. Para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C7-C40 (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (Adams, 2007; Nist, 2011).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado por meio da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em GC-FID. Os compostos com área relativa acima de 0,5% foram identificados e acima de 5% foram considerados majoritários (Mendes et al., 2018).

2.4 Bioensaios vegetais

Os experimentos com os bioensaios vegetais foram realizados no laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alegre, ES.

2.4.1 Ensaio de Fitotoxicidade

Foram testadas cinco concentrações do óleo essencial: 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$). A água destilada e o solvente diclorometano foram usados como controle negativo (C-), e o glifosato na concentração 0,1% v/v (mL/L) como controle positivo (C+). A escolha das concentrações do óleo essencial e do controle

positivo glifosato foi baseada no protocolo de ensaio de fitotoxicidade do grupo de pesquisa do laboratório que vem sendo adotado em diferentes estudos (Santos et al., 2017; Vasconcelos et al., 2019; Dutra et al., 2020).

Foram utilizados 25 (vinte e cinco) sementes de *L. sativa* e de *S. Bicolor* colocadas em placas de Petri, com 5 (cinco) repetições, totalizando 125 (cento e vinte e cinco) sementes para cada tratamento. As sementes foram colocadas em papel filtro umedecido com 2,5 mL da solução de óleo essencial dissolvidos no solvente diclorometano. As placas de Petri foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e colocadas em BOD à 24°C durante todo o experimento. A porcentagem de sementes germinadas foi observada após 8, 16, 24, 36 e 48 h de exposição aos tratamentos (Dutra et al., 2020). O crescimento das raízes e parte aérea foi determinado após 48 e 96 horas, respectivamente, de exposição as concentrações do óleo essencial, com auxílio de um paquímetro digital.

A partir dos dados obtidos, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação, após 48 h (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) calculado de acordo com Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ onde: G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas da primeira até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira até a última contagem. Foram avaliados também o crescimento radicular (CR) e crescimento de parte aérea (CA), em mm, segundo Aragão et al. (2015).

2.4.2 Ensaio de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

Após 48 h de exposição aos tratamentos, 10 (dez) raízes de alface de cada repetição foram coletadas e fixadas em Carnoy I (3:1 metanol + ácido acético), em seguida armazenadas a -20°C. Para estes testes somente raízes de alface foram utilizadas, pois é considerada um modelo adequado para análise microscópica para testar o efeito de compostos químicos (Silveira et al, 2017). Além disso, possui alta atividade proliferativa, crescimento rápido, cromossomos grandes, alta sensibilidade a compostos mutagênicos e genotóxicos e raízes fáceis de manipular (Andrade-Vieira et al. 2014; Aragão et al. 2017).

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento suave. As raízes selecionadas anteriormente, foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em solução de HCl 5N por 18 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a região meristemática foi retirada e colocada em uma lâmina e corada com orceína acética a 2% m/v (g/mL), recoberta por lamínula e esmagada suavemente. Foram avaliadas mil células por lâmina, totalizando 5.000 células meristemáticas observadas por tratamento.

A citotoxicidade foi avaliada mediante o índice mitótico (IM), cujo número de células em divisão foi dividido pelo número total de células observadas e multiplicado por cem. A genotoxicidade foi avaliada por meio da frequência de alterações cromossômicas (AC): perda cromossômica, cromossomos aderentes, c-metáfases, pontes, atrasos, anáfases com ponte - o somatório de cada uma das alterações, respectivamente, foi dividido pelo número total de divisões. Já a mutagenicidade foi analisada de acordo com a frequência de células com micronúcleo (MN), quantificadas por meio da divisão do número de células micronucleadas pelo número total de células observadas, multiplicado por cem a fim de obter a porcentagem.

2.5 Análise de Antimutagenicidade

Para avaliar o potencial antimutagênico do óleo essencial, sementes de *L. sativa* foram colocadas em placas de Petri umedecidas com água destilada para estimular a emissão radicular e mantidas em BOD a 24 ° C. Após aproximadamente 16 h, sementes com raízes de 1 a 2 mm foram transferidas para novas placas de Petri e submetidas aos seguintes experimentos: (E1) tratamento com óleo de *P. alata* na concentração de 187,5 ppm por 48 h; (E2) pré-tratamento com óleo de *P. alata* (187,5 ppm) por 24 h e tratamento subsequente com metanossulfonato de metila (MMS – Sigma Aldrich®) por 24 h; (E3) tratamento simultâneo com óleo (187,5 ppm) e MMS (1: 1) por 48 h; (E4) pré-tratamento com MMS por 24 h e pós-tratamento com óleo de *P. alata* (187,5 ppm) por mais 24 h. Após a exposição, as raízes foram coletadas e fixadas em solução de Carnoy I (3:1 metanol + ácido acético) e armazenadas a -20 ° C até o uso.

Água destilada e diclorometano (DCM) foram utilizados puros como controle negativo (C-), e uma solução de MMS (4×10^{-4} M) foi utilizada como controle positivo (C+). A antimutagenicidade foi estimada pela porcentagem de redução de danos em relação à frequência de micronúcleos. O MMS é utilizado como agente indutor de danos ao DNA (Mauro et al., 2014), sendo um dos seus principais efeitos o aumento na frequência de micronúcleos (Gulfishan et al., 2012).

Para cada um dos experimentos, 5 (cinco) lâminas foram preparadas para a avaliação citogenética do potencial antimutagênico. Cada lâmina foi preparada a partir de 2 meristemas de raízes de *L. sativa* previamente coletados e fixados. As raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em solução de HCl 5N à temperatura ambiente (20 a 25 ° C), esmagadas suavemente e coradas com orceína acética a 2% m/v (g/mL). Foram avaliadas 5.000 células meristemáticas para cada condição experimental estabelecida (E1, E2, E3 e E4) e controles (C - e C +).

Para verificar a atividade antimutagênica, calculou-se a porcentagem de redução do dano em relação ao micronúcleo (MN), calculado pela seguinte fórmula: $RD = [(células\ MN\ em\ A - células\ MN\ em\ B) / (células\ MN\ em\ A - Células\ MN\ em\ C)] \times 100$, onde A é o agente indutor de danos ao DNA, B é o tratamento antimutagênico e C é o controle negativo (Malini et al., 2010).

2.6 Análise Estatística

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

Os dados antimutagênicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal – Wallis, com significância de $p < 0,05$. A análise foi realizada no software aberto “R” (R Development Core Team, 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Rendimento e composição química do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial de *P. alata* foi de 0,51% m/m, por fração fresca de folha. A partir das análises cromatográficas foram identificados 7 compostos, correspondendo à 63,98% de fenilpropanóides; 31,94% de sesquiterpenos e 4,08% de monoterpenos (Tabela 1, figura 2). Foram encontrados os seguintes compostos majoritários: miristicina (37,87%), *gamma*-cadineno (28,13%), safrol (16,37%) e *o*-metileugenol (9,74%).

Tabela 1. Compostos identificados (>0,5%) no óleo essencial de *Peperomia alata*.

Composto ^a	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção Calculado ^b	Índice de Retenção Literatura ^c	Área relativa (%) ^d	Classificação ^e
D-limoneno	12,424	1027	1024	3,00	Monoterpeno
<i>alfa</i> -terpineol	19,952	1191	1186	1,08	Monoterpeno
safrol	23,695	1273	1278	16,37	Fenilpropeno
<i>o</i> -metileugenol	29,607	1409	1403	9,74	Fenilpropeno
biciclogermacreno	33,097	1494	1500	3,81	Sesquiterpeno
<i>gama</i> -cadineno	33,611	1507	1513	28,13	Sesquiterpeno
miristicina	34,400	1528	1526	37,87	Fenilpropeno

^a Os compostos foram identificados pelo Índice LTPRI (GC/FID) e Espectrometria de Massa (GC/MS) utilizando a coluna Rtx ®-5MS. ^b Índice de retenção calculado a partir de dados obtidos por amostragem de n-alcenos saturados (C7-C40). ^c Índice de Retenção Tabulado (Adams, 2007; NIST, 2011). ^d Foram identificados compostos com áreas relativas >0,5%. ^e Classificação dos compostos.

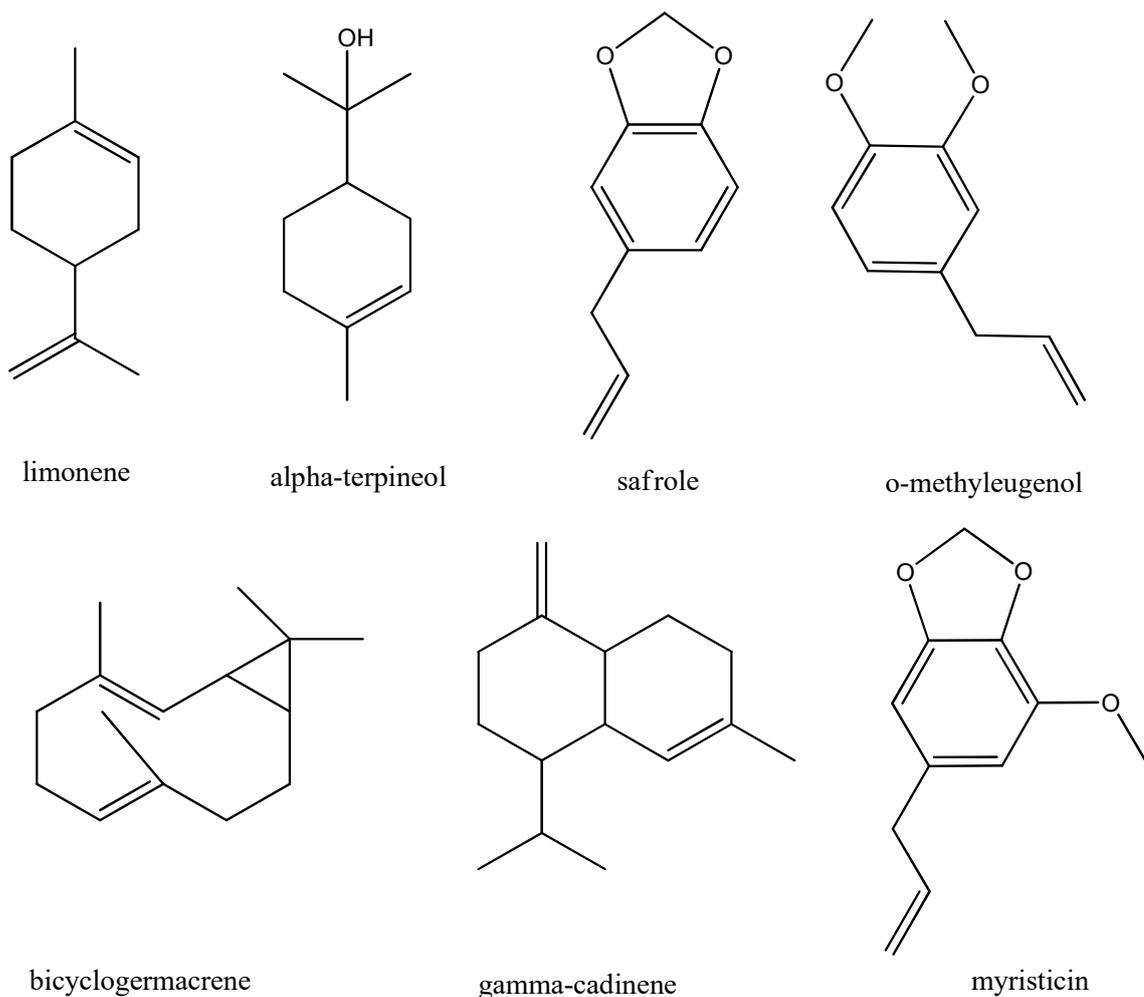


Figura 2: Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial de *Peperomia alata*.

3.2 Fitotoxicidade

Por meio dos ensaios com *L. sativa* (alface) e *S. bicolor* (sorgo), foram avaliados a porcentagem de germinação (%Ger), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA). As duas plantas modelo sofreram inibição gradual, de acordo com o aumento das concentrações em todas as variáveis analisadas (Figuras 3 e 4).

Para o teste realizado em alface, foi observado 100% de inibição na concentração do óleo essencial de 3000 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para todas as variáveis (Figura 3). Nos demais tratamentos foi observado que houve redução significativa na germinação para as concentrações de 1500 e 750 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e suas médias

foram menores que os controles negativos e positivo. Já nas concentrações de 375 e 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) as médias se aproximaram aos controles positivo e negativos. Para o IVG em alface, houve redução significativa em todas as concentrações, quando comparadas aos controles negativos e positivo. Para o crescimento radicular e aéreo, também houve redução significativa em todas as concentrações e as médias ficaram próximas ao controle positivo. Vale ressaltar que em alface, o CA foi inibido 100% nas concentrações de 3000, 1500 e 750 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

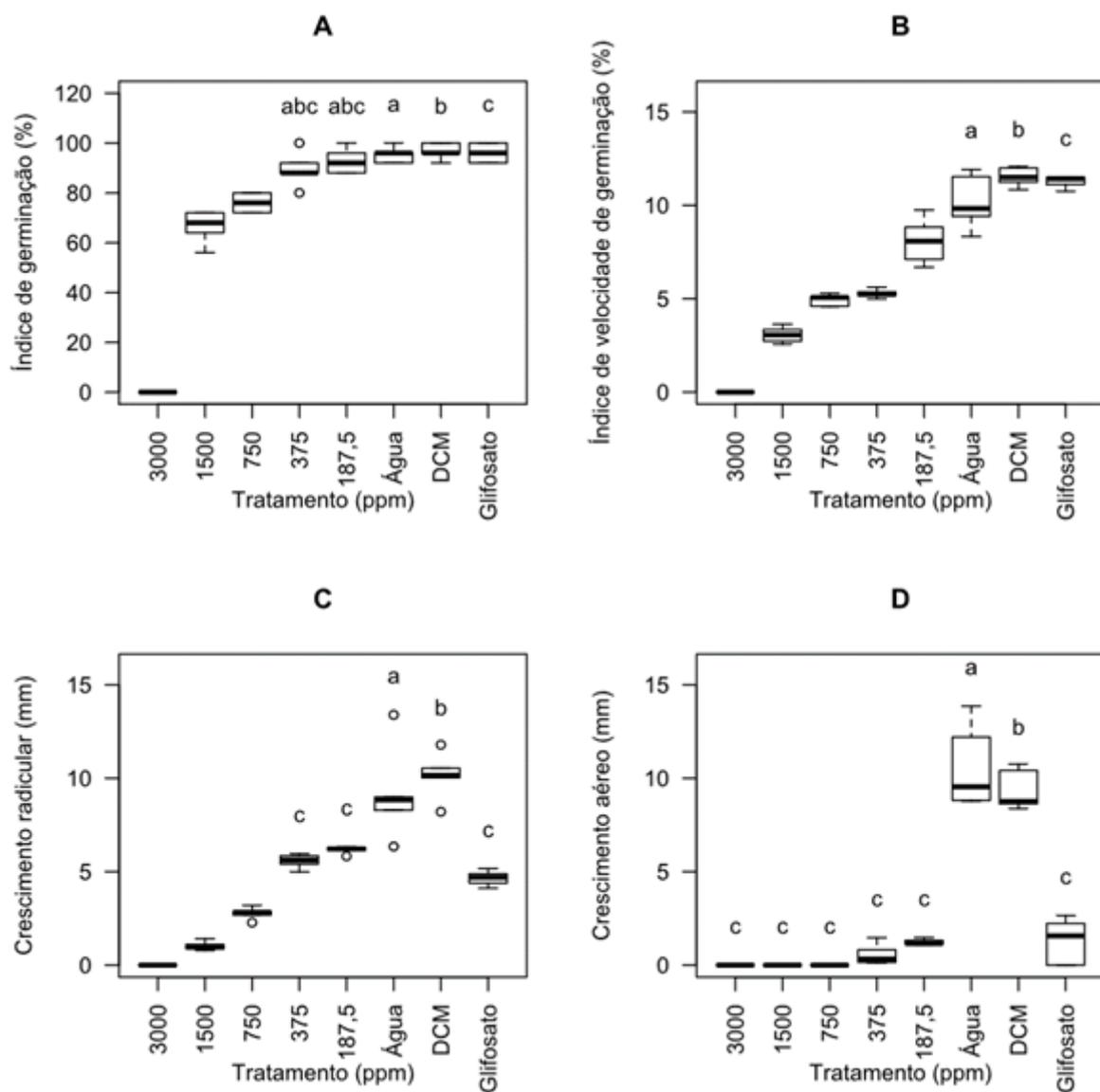


Figura 3: Fitotoxicidade do óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm) sobre sementes de *L. sativa*. (A) Índice de germinação (%); (B) Índice de velocidade de germinação (IVG) (%); (C) Crescimento radicular (mm); (D) Crescimento aéreo (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Dunnett ($P > 0,05$).

No sorgo também foi observado 100% de inibição na concentração de 3000 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para todas as variáveis (Figura 4). Nas demais concentrações foi notado que, a germinação e o IVG apresentaram redução significativa para 1500 e 750 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$), em relação aos controles negativos e positivo. Já as concentrações 375 e 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$), ficaram com médias próximas aos controles positivo e negativo, em ambas as variáveis. Para o CR e CA, foi observado que apenas a concentração de 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou média próxima aos controles negativos e positivo, e para as demais concentrações (1500, 750 e 375 ppm) ($\mu\text{g mL}^{-1}$), houve redução significativa quando comparadas aos controles negativos e positivo. Esses resultados demonstram efeito fitotóxico do óleo essencial de *P. alata* para os dois modelos vegetais testados: alface e sorgo.

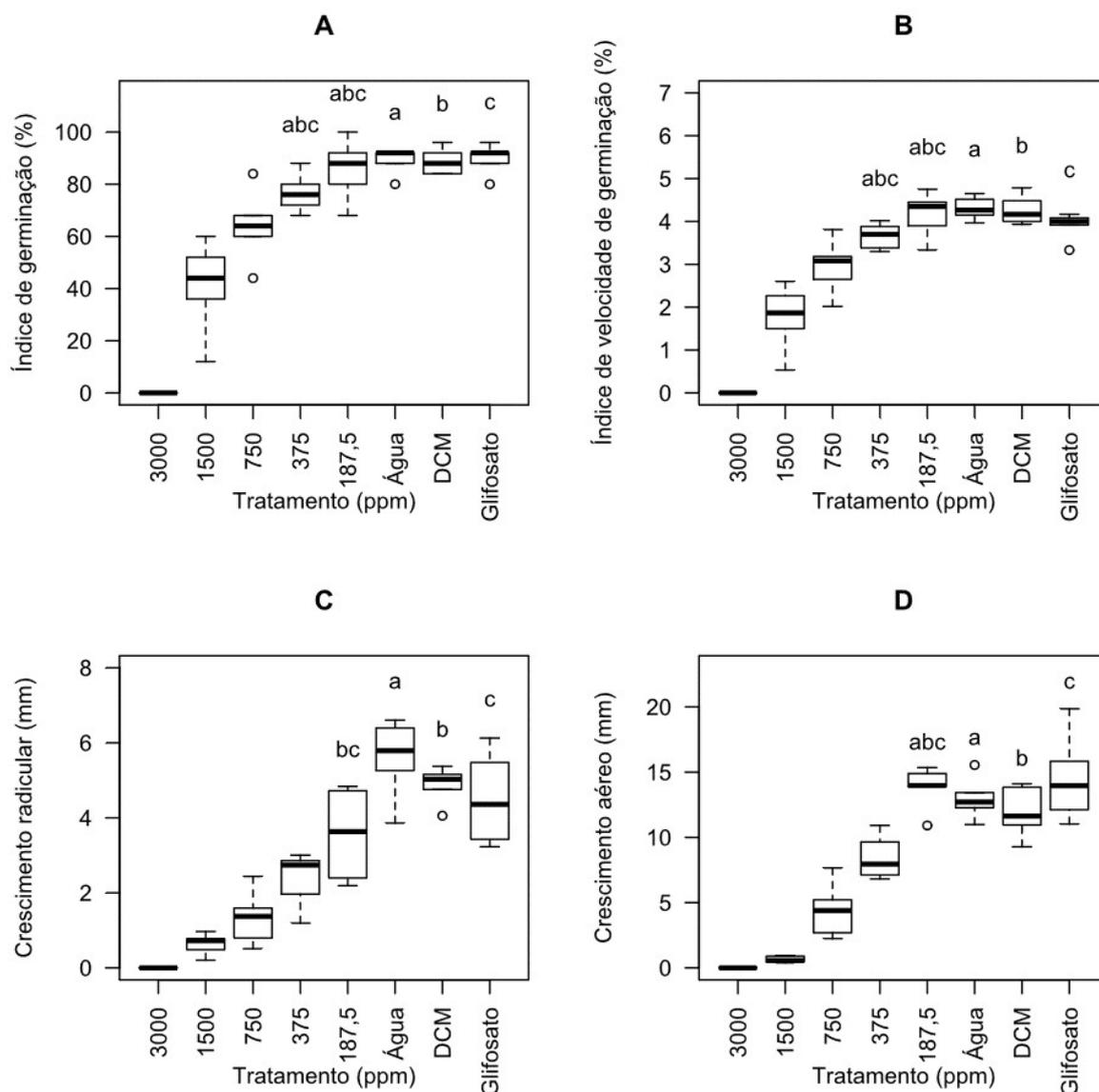


Figura 4: Fitotoxicidade do óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm) sobre sementes de *S. bicolor*. (A) Índice de germinação (%); (B) Índice de velocidade de germinação (IVG) (%); (C) Crescimento radicular (mm); (D) Crescimento aéreo (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Dunnnett ($P > 0,05$).

3.3 Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico em células meristemáticas de *L. sativa*. Foi observado que as concentrações 750 e 187,5 ppm apresentaram redução significativa em relação ao controle negativo água (Tabela 2).

Em relação aos danos genotóxicos foram consideradas as células com alterações cromossômicas, desconsiderando as células micronucleadas. O

tratamento de 1500 ppm se destacou, apresentando valor mais expressivo (15,76%), em relação aos demais tratamentos e controles negativos e positivo (Tabela 2).

Tabela 2. Índice mitótico e alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Peperomia alata*.

Tratamento	1500 ppm	750 ppm	375 ppm	187,5 ppm	Água (-)	DCM (-)	Glifosato (+) 0,1% (mL/L)
IM%	8,64±0,69 ^{ab}	7,56±0,78 ^b	10,00±0,94 ^{ab}	7,78±0,66 ^b	9,28±0,96 ^a	9,06±1,30 ^b	5,30±0,60 ^c
MN%	0,10±0,08 ^{abc}	0,08±0,07 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,09±0,08 ^c
AC%	15,76±4,20	7,11±1,75 ^{ab}	7,86±2,65 ^{ab}	7,74±2,25 ^{ab}	5,86±1,46 ^a	4,34±0,63 ^b	2,43±0,63 ^c
Perda%	0,90±1,45 ^{abc}	0,25±0,58 ^{abc}	0,18±0,42 ^{abc}	0,52±0,71 ^{abc}	0,24±0,55 ^a	0,18±0,40 ^b	0,00±0,00 ^c
Aderência%	10,88±4,27	4,59±1,22 ^a	6,70±1,63 ^a	5,87±3,21 ^a	3,84±1,11 ^a	1,80±2,10 ^b	1,64±1,82 ^c
C-metáfase%	3,23±3,44 ^{ab}	1,54±1,67 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,28±0,63 ^{abc}	0,90±0,50 ^a	0,81±1,21 ^b	0,00±0,00 ^c
Ponte%	0,26±0,59 ^{abc}	0,25±0,58 ^{abc}	0,61±0,94 ^{abc}	0,80±1,22 ^{abc}	0,88±1,21 ^a	0,84±0,81 ^b	0,44±0,99 ^c
Atraso%	0,23±0,52 ^{abc}	0,48±0,66 ^{abc}	0,37±0,84 ^{abc}	0,27±0,62 ^{abc}	0,00±0,00 ^a	0,71±0,66 ^b	0,35±0,79 ^c
Quebra%	0,26±0,59 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,00±0,00 ^{abc}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^c

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Dunnett ($P>0,05$). IM – Índice mitótico; MN – Micronúcleo; AC – Alterações cromossômicas.

Foi verificada diferença significativa para aderência cromossômica. Na concentração de 1500 ppm foi observado o valor mais elevado em comparação aos demais tratamentos e aos controles negativos e positivo (Tabela 2). As demais concentrações apresentaram valores próximos ao controle negativo (água).

Outras alterações também foram observadas, ainda que em frequências menores, dentre elas: perda cromossômica, c-metáfase, ponte em anáfase e atraso (Figura 5, tabela 2).

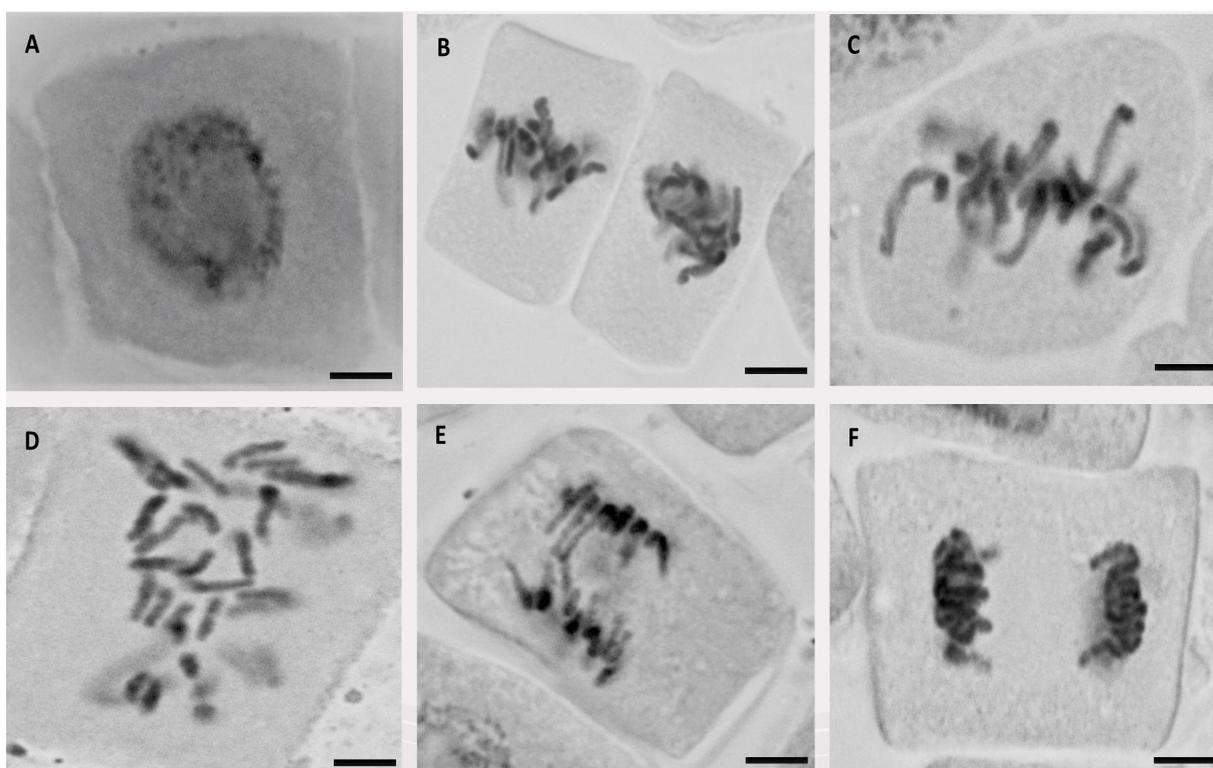


Figura 5: Células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com óleo essencial de *P. alata* (187,5 – 3000 ppm). (A) interfase normal, (B) metáfase aderente, (C) metáfase com perda cromossômica, (D) c-metáfase, (E) ponte em anáfase e (F) atraso em telófase. Barra: 10 μ m.

Para os danos mutagênicos, foram consideradas as células com micronúcleos. Observou-se que não houve aumento significativo em nenhum dos tratamentos testados com o óleo essencial (Tabela 2).

3.4 Antimutagenicidade

Para análise da antimutagenicidade foi utilizada a menor concentração do óleo essencial de *P. alata* 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por não apresentar nenhum tipo de dano genotóxico ou mutagênico para *L. sativa*.

Foi observado que houve redução de danos mutagênicos de 74,68% no pré-tratamento, 68,35% no tratamento simultâneo e 84,81% no pós-tratamento (Tabela 3). Vale ressaltar que a maior frequência de redução de danos ocorreu quando as células foram submetidas primeiro ao MMS e posteriormente expostas ao óleo essencial de *P. alata*.

Tabela 3. Porcentagem de redução de danos em relação ao micronúcleo em células de *L. sativa* após exposição ao óleo essencial de *P. alata* na concentração de 187,5 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) associado ao MMS (4×10^{-4} M).

EXPERIMENTO	MN (%)	RD (%)
E1	0,02±0,04 ^{ab}	-
E2	0,21±0,11	74,68
E3	0,26±0,14	68,35
E4	0,13±0,12	84,81
água	0,00±0,00 ^a	-
DCM	0,01±0,03 ^b	-
MMS	0,80±0,20 ^c	-

As médias seguidas de desvio padrão com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis. Onde, E1= 48h óleo; E2 = 24h óleo e 24h MMS; E3 = 48h óleo + MMS 1:1; E4 = 24h MMS e 24h óleo; MN = micronúcleo; RD = redução de danos.

4. DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e composição química do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial de *P. alata* foi de 0,51% m/m, sendo identificados por cromatografia gasosa os seguintes compostos: D-limoneno, *alfa*-terpineol, safrol, *o*-metileugenol, biciclogermacreno, *gama*-cadineno e miristicina. Esses dados demonstram que dentro do gênero algumas espécies possuem composição química semelhantes (De Lira et al., 2009; Robayo-Gama et al., 2010; Dorla et al., 2017; Okoh et al., 2017).

Os constituintes químicos presentes no óleo essencial foram classificados e correspondem à 63,98% de fenilpropanoides; 31,94% de sesquiterpenos e 4,08% de monoterpenos (Tabela 1). Esses resultados corroboram com o relato de que, geralmente, quando presentes nos óleos essenciais, os fenilpropanoides, ocorrem em quantidades significativas e tendem a ser os compostos majoritários (Simões et al., 2010), havendo outros em menores quantidades (Felipe et al., 2017). Na literatura existem outras espécies de *Peperomia*, por exemplo, *P. pellucida* e *P. subespatulata* em que os principais componentes também são os fenilpropanoides (De Diaz et al., 1988). Os fenilpropanoides e terpenos se destacam devido à sua versatilidade e diversidade de aplicação biológica, apresentando características antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante, herbicida, inseticida, antitumoral, antiviral, dentre outras (Simões et al., 2007).

De acordo com Jemâa et al. (2012), a quantidade dos constituintes químicos no óleo essencial afeta diretamente sua qualidade e determina seu possível aproveitamento industrial e, conseqüentemente, o seu valor comercial. É interessante destacar que as defesas químicas das plantas se apresentam não como substâncias individualizadas, mas sim como misturas complexas de compostos. Os óleos essenciais possuem compostos em diferentes concentrações (majoritárias e minoritárias). Assim, os efeitos biológicos podem ser devido a interação entre tais compostos, como resultado de efeitos sinérgicos, aditivos, antagônicos e potenciações. Estes efeitos podem ocorrer via interação entre todas as moléculas presentes nos óleos essenciais ou por meio da interação entre determinados componentes, principalmente os majoritários (Bakkali et al., 2008). Contudo, componentes minoritários também podem atuar como agentes sinérgicos,

aumentando o efeito dos principais (Nerio et al., 2009; Hummelbrunner et al., 2001) ou como agentes antagônicos, provocando a redução do efeito (Izzo et al., 2001). A importância do efeito sinérgico consiste no aumento dos efeitos biológicos dos óleos essenciais (Kostic et al., 2013), pois o sinergismo que ocorre entre os compostos presentes nos óleos essenciais de plantas pode resultar numa maior bioatividade do que a observada para os compostos isolados (Rattan, 2010).

Neste trabalho foram identificados os seguintes compostos majoritários: miristicina (37,87%), *gama*-cadineno (28,13%), safrol (16,37%) e *o*-metileugenol (9,74%). A miristicina também é encontrada como um dos componentes do óleo essencial de *Drimys angustifolia* Miers, no óleo essencial da noz-moscada e da *Perilla frutescens*, planta nativa da China, Coréia e Japão (Hethelyi et al., 2009). Efeitos benéficos são atribuídos a miristicina destacando-se dentre eles as ações inseticidas, fungicidas e ativador de glutathione S transferase prevenindo a formação de tumores (Soliman et al., 2003; Nguefack et al., 2004). Já o *gama*-cadineno, se trata de um sesquiterpeno que contribui com o aroma floral e verde (Tu et al., 2002). Quanto aos compostos safrol e *o*-metileugenol, ambos fenilpropanoides apresentam propriedades inseticidas descrita na literatura (Souto et al., 2012; Krinski e Foerster, 2016). O gênero *Piper*, um dos principais da família Piperaceae, possui grande variedade de substâncias, dentre eles, os mais vinculados às atividades biológicas são miristicina, metileugenol e safrol (Guimarães et al., 2009; Torres-Pelayo et al., 2016), constituintes encontrados também no óleo essencial de *P. alata*.

Além dos compostos majoritários descritos anteriormente, foram identificados também em menores quantidades o biciclogermacreno (3,81%), D-limoneno (3,00%) e *alfa*-terpineol (1,08%). O composto biciclogermacreno, possui atividade antifúngica e têm sido identificados em extratos de outras espécies. O óleo essencial de *Piper cernuum* e *P. regnellii* cuja composição contém entre outros compostos, biciclogermacreno, mostrou que ele tem também atividade antimicrobiana (Cysne et al., 2005; Ngassapa et al., 2016). Já o limoneno é um monoterpeno cíclico insaturado que pode ocorrer em duas formas ópticas (D-limoneno e L-limoneno) ou em uma mistura racêmica (DL-limoneno), sendo o D-limoneno a forma mais importante comercialmente devido ao seu aroma e sabor (Cao et al., 2016). Suas aplicações incluem desde aromatizante em bebidas, doces, produtos de limpeza e perfumes, inseticidas, precursor para compostos aromáticos ou medicinais (como o

ácido perílico, carvona e mentol), a unidade básica para produção de polímeros e combustível (Cao et al., 2016; Jongedijk et al., 2016). O *alfa*-terpineol, que assim como os diversos derivados oxigenados de monoterpenos, é reconhecido por sua nota aromática agradável e por suas atividades antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória (Jun et al., 2006; Burdock et al., 2010).

4.2 Fitotoxicidade

Na análise de fitotoxicidade, as duas espécies modelo *L. sativa* (alface) e *S. bicolor* (sorgo), apresentaram inibição gradual para todas as variáveis avaliadas, de acordo com o aumento das concentrações do óleo essencial de *P. alata* (Figuras 3 e 4). Estes efeitos podem estar relacionados aos compostos miristicina, safrol, *o*-metileugenol, biciclogermacreno e D-limoneno, presentes no óleo essencial de *P. alata*, e que são envolvidos em diferentes atividades biológicas (Torres-Pelayo et al., 2016), e que pode sugerir ação aleloquímica do óleo essencial desta espécie.

Monoterpenos e sesquiterpenos possuem atividade como inibidores de crescimento aéreo e de crescimento radicular sobre diversas espécies vegetais (Sampietro, 2017). No presente estudo, o óleo essencial apresentou a diminuição dessas variáveis em diferentes concentrações para alface e sorgo, isto pode ser devido a sua composição química que é composta por sesquiterpenos e monoterpenos. O óleo essencial da espécie (*Piper longum*) também revelou potencial para inibir germinação de sementes, resultado atribuído à composição química, especialmente em relação à presença de monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos (Souza-Filho et al., 2009).

Observou-se também que todas as variáveis avaliadas em ambas as espécies - alface e sorgo - apresentaram 100% inibição na concentração maior, de 3000 ppm. A atividade biológica de um dado aleloquímico depende tanto da concentração como do limite da resposta da espécie afetada. O limite de inibição para um dado químico não é constante, porém está intimamente relacionado à sensibilidade da espécie receptora, aos processos metabólicos da planta e às condições ambientais (Souza Filho et al., 2009). A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas

(Oliveira et al., 2012; Jesus et al., 2013; Silva et al., 2020). A composição química e a atividade biológica das espécies de angiospermas basais podem estar relacionadas, pois estes são produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal, atuando como agentes que podem inibir a germinação devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico (Henriques et al., 1999). Estudos realizados com extratos aquosos das folhas e óleos essenciais de *Eucalyptus*, demonstraram que várias espécies do gênero apresentam aleloquímicos que inibem a germinação e o crescimento de outras espécies de plantas, dentre eles os monoterpenos *alfa*-terpineol e limoneno (Barbosa et al., 2016; Yakubu et al., 2018), compostos presentes no óleo essencial de *P. alata*.

Foi observado também redução significativa do IVG tanto em alface, quanto em sorgo, quando comparado aos controles negativos e positivo. O decréscimo no IVG pode indicar que a presença de aleloquímicos inibe a velocidade de desenvolvimento e translocação de componentes nutritivos do endosperma para o embrião (Azambuja et al., 2010). No presente trabalho todas as variáveis foram afetadas, mas pode acontecer em algumas situações do efeito alelopático não impedir a germinação, mas se manifestar por meio do IVG ou outro parâmetro, com isso é importante acompanhar diariamente a velocidade de germinação (Ferreira et al., 2000).

É interessante ressaltar que ocorreu inibição total do CA de *L. sativa*, nas concentrações de 3000 ppm, 1500 ppm e 750 ppm e que as concentrações de 375 ppm e 187,5 ppm apresentaram pouco desenvolvimento. Ou seja, o CA em alface apresentou resultados semelhantes ao glifosato, o que indica ação dos compostos encontrados no óleo essencial de *P. alata* pois estes conseguem inibir a germinação e o crescimento das plantas (Cheng e Cheng, 2015). Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém, os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comumente encontradas (Barbosa, 2004; Bakkali et al., 2008). Souza Filho et al., (2009) encontraram vários compostos com caráter inibitório sobre sementes em óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, dentre os quais se destacou o safrol, sendo este um dos compostos presente no óleo essencial de *P. alata*, sendo inclusive um dos majoritários.

Os aleloquímicos liberados pelos vegetais são capazes de interferir na germinação das sementes, na velocidade de germinação, no crescimento inicial das

plântulas, na assimilação de nutrientes, na atividade fotossintética e de várias enzimas e na perda de nutrientes pela permeabilidade da membrana celular (Graña et al., 2013; Jabran et al., 2015; Yan et al., 2015). Essas substâncias atuam diretamente, ou na sinalização de processos de degradação celular, por meio da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo celular (Qian et al., 2009). As EROs são formas reduzidas de oxigênio energeticamente mais reativas que o oxigênio molecular, sendo compostos com maior facilidade em reagir com outras substâncias e capazes de gerar danos aos componentes celulares, como: peroxidação lipídica de membranas, inativação de enzimas devido a desnaturação, oxidação de carboidratos, danos na conformação dos ácidos nucléicos e do complexo do fotossistema II (PS II) (Gill e Tuteja, 2010).

Esses processos fisiológicos anormais resultam na redução da fotossíntese bem como no aumento da respiração, contribuindo para a redução do crescimento das plantas (Almeida et al., 2008). Algumas classes de aleloquímicos conseguem intervir na fotossíntese induzindo mudanças no teor de clorofila das plantas. Entre os mais citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos estão os terpenos, classe da qual fazem parte os compostos do óleo essencial de *P. alata*. Os terpenoides, dentre os quais existem compostos voláteis, são substâncias com diversas atividades biológicas em plantas, atuando como moléculas de sinalização, agentes fotoprotetores, hormônios reprodutivos, e como aleloquímicos, auxiliando no estabelecimento do vegetal no ambiente (Latif et al., 2017; Rice, 2012). Os terpenos voláteis também conseguem alterar a permeabilidade da membrana, como o caso dos terpenos voláteis de *Eucalyptus citriodora* Hook. (Benchaa et al., 2018) e espécies do gênero *Satureja* (Taban et al., 2013).

4.3 Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico em células meristemáticas de *L. sativa* submetidas a diferentes tratamentos com óleo essencial de *P. alata* (Tabela 2). O nível citotóxico do agente pode ser determinado tanto pelo aumento quanto pela diminuição do IM (Lubini et al., 2008; Maschio, 2009). O primeiro poderia ser uma consequência da proliferação celular desordenada, potencialmente levando à

formação de tumores. Por outro lado, a redução do IM poderia ser explicada pela perturbação na divisão celular, o bloqueio do início da prófase e, conseqüentemente, o impedimento da divisão e proliferação celular (Grippa et al., 2010; Aragão et al. 2015; Soltys et al., 2011).

Houve redução significativa nas concentrações de 750 e 187,5 ppm em relação ao controle negativo água (Tabela 2). O índice mitótico, as alterações nucleares e cromossômicas estão relacionadas com os parâmetros macroscópicos e de desenvolvimento, uma vez que o crescimento do órgão de uma planta está concernente com o número de células produzidas durante divisão celular e do alongamento celular durante o processo de diferenciação e desenvolvimento (Aragão et al., 2015). Assim, quando há a diminuição do índice mitótico em razão da exposição ao óleo essencial, o número de divisões celulares e de células viáveis é reduzido, dificultando o desenvolvimento de órgãos vegetais, como é o caso das raízes, em que seu crescimento depende do aumento do número de células.

Quanto ao potencial genotóxico, o tratamento de 1500 ppm se expressou significativamente (Tabela 2). As alterações cromossômicas podem ocorrer tanto na estrutura quanto no número de cromossomos, podendo ser espontâneas ou induzidas como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (Russel 2002). No geral, fragmentos e pontes cromossômicas demonstram um mecanismo de ação clastogênico da substância testada, estando relacionada à sua genotoxicidade; diferentemente, cromossomos perdidos, pegajosos e c-metáfases estão relacionados a mecanismos de ação aneugênicos e efeito citotóxico da substância (Leme e Marin Morales, 2009; Pinheiro et al., 2015; Aragão et al., 2017; Alves et al., 2018; Santos et al., 2019).

A aderência cromossômica foi a alteração mais observada. Essa alteração é um indicador da influência tóxica no material genético, sendo provavelmente irreversível. Trata-se de um tipo de anormalidade nas proteínas histônicas da cromatina e não o próprio DNA e, geralmente determina a morte celular (Fernandes et al., 2009; Freitas et al., 2016). A aderência cromossômica pode desencadear outras alterações como pontes e micronúcleos, já que os cromossomos tendem a permanecer juntos e, quando separados, sofrem rupturas cromossômicas (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016).

Outras alterações também foram notadas, ainda que em frequências menores, dentre elas: perda e aderência cromossômica, c-metáfases, pontes, atrasos e quebras. Esses fenômenos podem ser derivados de problemas com os microtúbulos (microtúbulos interrompidos ou desenvolvidos de forma incompleta), uma vez que essas estruturas são importantes componentes do fuso mitótico e os fusos são os responsáveis pela segregação correta dos cromossomos para as células filhas (Vidakovic-Cifrek et al., 2002; Fernandes et al., 2007). Já as pontes cromossômicas surgem como decorrência da junção de extremidades cromossômicas quebradas, formando cromossomos que se ligam aos dois polos do fuso mitótico (Costa et al., 2014).

Quanto ao potencial mutagênico, observou-se que não houve aumento significativo em nenhum dos tratamentos testados com o óleo essencial de *P. alata*.

4.4 Antimutagenicidade

O teste de antimutagenicidade foi avaliado por meio da redução de danos em relação ao micronúcleo. O estudo de danificação do DNA em seu nível cromossômico é uma etapa essencial da investigação sobre a toxicidade genética, já que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese. A taxa de micronúcleos representa um dos principais parâmetros observados para a avaliação de atividade antimutagênica, porque possibilita a avaliação confiável tanto da perda (evento aneugênico) quanto da ruptura cromossômica (evento clastogênico) (Ribeiro et al., 2018; Fenech, 2008; Fiskesjö, 1985).

O agente mutagênico MMS é um alquilante capaz de interagir com macromoléculas, tais como o DNA (Malini et al., 2010). Este agente modifica o DNA pela adição de grupos metil a uma série de sítios nucleofílicos nas bases do DNA formando adutos. Os adutos mais frequentes são a 7-metilguanina (N7-MeG), a 3-metiladenina (N3-MeA) e a O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) (Wyatt e Pittman, 2006). O MMS expõe elevada ação clastogênica. Este agente clastogênico tem a capacidade de induzir trocas entre cromátides irmãs (Kaina e Aurich, 1985) e os grupos metil adicionados por ele ao DNA causam anomalias cromossômicas (Kaina, 2004). Em plantas, o MMS é utilizado na avaliação da resposta a agentes causadores de danos

ao DNA, sendo já bem estabelecido como controle positivo para algumas espécies (Liman et al., 2015; Liu et al., 2013). Dentre os efeitos do MMS destaca-se o aumento na frequência de micronúcleos e fragmentos (Mauro et al. 2014).

Neste estudo foi observado que houve redução de danos mutagênicos de 74,68% para o (E2) pré-tratamento, 68,35% no (E3) tratamento simultâneo e 84,81% no (E4) pós-tratamento (Tabela 3). Esses resultados indicam que o óleo essencial de *P. alata* pode inativar o agente mutagênico por meio do bloqueio ou modificação para que não entre em contato com o material genético (desmutagênese) ou modulando a replicação e o reparo do DNA, inibindo os possíveis erros do sistema de reparo (bioantimutagênese) (Gheller et al., 2017).

A maior frequência de redução de danos ocorreu quando as células foram submetidas primeiro ao MMS e posteriormente expostas ao óleo essencial de *P. alata*, esses dados podem indicar um efeito preferencialmente bioantimutagênico desta espécie, significando que o dano genotóxico causado pelo MMS está sendo reduzido ou reparado pela presença do óleo essencial de *P. alata*, fato que pode estar associado à ação dos fitoconstituintes do óleo na modulação do sistema de reparo de DNA (Mauro et al., 2014). A miristicina, composto majoritário em maior quantidade, por exemplo, é considerado agente quimiopreventivo eficaz contra o câncer (Zheng, et al., 1992). Além disso é reportada atividade antioxidante para a miristicina e *o*-metileugenol (Silva et al, 2010). O composto D-limoneno, também pode atuar na prevenção de várias doenças, incluindo o câncer (Economos e Clay, 1999). Já o *alfa*-terpineol mostrou ser um forte agente quelante de íons Fe^{2+} , em estudos de Di Sotto et al. (2013), observaram que a quelação do íon ferroso é uma forma indireta de atividade antioxidante, por proteger as células do dano oxidativo do DNA, induzido pela produção de espécies reativas ao oxigênio, que pode estar envolvida também na antimutagenicidade da substância.

A busca por novos agentes antimutagênicos é de extrema importância, tendo em vista que muitos agentes anticarcinogênicos são também antimutagênicos e, desse modo, são capazes de proteger contra outras doenças além do câncer (Ślarczyńska et al., 2014). Os sistemas vegetais representam uma alternativa eficiente e acessível para indicar o potencial de antimutagenicidade e genotoxicidade em substâncias isoladas ou misturas complexas (Kuhn et al., 2015).

Além disso, os resultados obtidos com células vegetais demonstraram ter boa correlação com os leucócitos humanos (Palmieri et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

Os testes realizados com os organismos modelos *L. sativa* e *S. bicolor* demonstraram que o óleo essencial de *P. alata* possui compostos bioativos. Os efeitos de inibição gradual observados na germinação, CR e CA demonstraram que o óleo essencial de *P. alata* possui potencial fitotóxico principalmente nas concentrações 3000, 1500 e 750 ppm, sugerindo ação dos seus compostos para obter esse controle em eudicotiledoneas e monocotiledôneas.

Para o teste de citotoxicidade foi verificado que houve comprometimento do índice mitótico nas concentrações 750 e 187,5 ppm, indicando assim que o óleo essencial de *P. alata* apresentou potencial citotóxico quando testado em células meristemáticas de *L. sativa*. Portanto, as análises de fitotoxicidade e citotoxicidade indicam que em altas concentrações o óleo essencial de *P. alata* podem apresentar potencial alelopático.

No teste genotóxico houve resposta na concentração de 1500 ppm, porém a única alteração significativa foi o cromossomo aderente, o que sugere que não houve fixação de danos. Com isso não foi expressa atividade mutagênica.

Foi verificada também atividade antimutagênica avaliada em células meristemáticas de *L. sativa*, sendo que os resultados indicam que o óleo essencial de *P. alata* pode inativar o agente mutagênico (desmutagênese) ou modular a replicação e o reparo do DNA (bioantimutagênese), contudo a maior taxa de redução de danos foi no pós-tratamento, indicando efeito preferencialmente bioantimutagênico desta espécie.

Esses resultados sugerem que o óleo essencial de *P. alata* pode ser utilizado como alternativa para fabricação de novos produtos à base de substâncias naturais, como bioherbicidas e fármacos, pois seus constituintes conferem atividade biológica.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, Alegre - ES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória - ES) pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. EUA: **Allured Publishing Corporation**, p. 804, 2007.

AJITH, T. A.; SOJA, M. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. **Cell Biol Toxicol**, v. 22, p. 269-274, 2006.

ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomia**, v. 61, p. 4237-4247, 2008.

ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, v. 1, p. 12126, 2015.

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

ALVES, N. S. F.; SETZER, W. N.; SILVA, J. K. R. The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 90-102, 2019.

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

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

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PALMIERI, M. J.; BOTELHO, C. M.; LUBER, J.; SILVA, M. F. F. Evaluation of the antimutagenic potential of *Psidium guajava* L. extracts via plant bioassays. **South African Journal of Botany**, 113, 443-448, 2017.

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

ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biologia Tropical**. v. 65, p. 1-10, 2017.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed., Viçosa: UFV, 416 p, 2004.

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, p. 1958-1972, 2012.

ASLAM, D. N.; HORWATH, W.; VANDERGHEYNST, J. S. Comparison of several maturity indicators for estimating phytotoxicity in compost-amended soil. **Waste Management**, v. 28, p. 2070-2076, 2007.

AZAMBUJA, N.; HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S.; GOULART, P. L. Potencial alelopático de *Plectranthus barbatus* Andrews na germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. e de *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, p. 66-73, 2010.

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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 215 p. 2004.

BATISTA J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **Journal of Organic Chemistry** v. 76, p. 2603-2612, 2011.

BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, vol. 53, 6051-6054, 2012.

BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical Variability and Bio-logical Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. **Molecules**, n. 21, 2016.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. **CRC Press**, p. 994, 2012.

BECAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, p. 140-145, 2012.

BENCHAA, S.; HAZZIT, M.; ABDELKRIM, H. Allelopathic Effect of *Eucalyptus citri-odora* Essential Oil and Its Potential Use as Bioherbicide. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 8, 2018.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; SILVA FERREIRA, M. F. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollut**, 226: 207, 2015.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BRAIT, D. R. H.; VAZ, M. S. M.; ARRIGO, J. S.; CARVALHO, L. N. B.; ARAÚJO, F. H. S.; VANI, J. M.; MOTA, J. S.; CARDOSO, C. A. L.; OLIVEIRA, R. J.; NEGRÃO, F. J.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, 73: 699-705, 2015.

BURDOCK, G. A., FENAROLI, G. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**, 6. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural product – derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, p.475-516, 2008.

CAO, X.; YU-BEI, L. V.; CHEN, J.; IAMANAKA, T.; WEI, L. J.; HUA, Q. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 9, p. 214-224, 2016.

CARNEIRO, C. C. **Avaliação das atividades genotóxica, antígeno-tóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitaninos utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo***. Tese – (Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 123 f., 2016.

CARVALHO, M. S. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; SANTOS, F. E.; CORREA, F. F.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; VILELA, L. R. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. **Sci. Hortic. (Amsterdam)**, v. 245, p. 90-98, 2019.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 1-16, 2015.

COSTA, A. C.; DOMINGUES, G.; DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I, V.; VICENTINI, V. E. P. Citotoxicidade das águas do rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 248-258, 2014.

COSTA, M. M. **Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante da espécie *Hyptis pectinata***. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

CRIA – **speciesLink**. Disponível em: <<https://goo.gl/0u1QxH>>. Acesso em: 12 maio 2016.

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

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E.P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1378-1381, 2005.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.** 521, p. 121-135, 2002.

DE DÍAZ, A. M. P.; DÍAZ, P. P.; CARDOSO, H. Volatile Constituents of *Peperomia subespatulata*. **Planta Med.** 54, 92-93, 1988.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. Mutagenesis and cardiovascular diseases. ocular mechanisms, risk factors, and protective factors. **Mutation research.** v. 621, p. 5-17, 2007.

DE LIRA, P. N. B.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; SOUSA, P. J. C.; SILVA, N. N. S.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of Three *Peperomia* Species from the Amazon, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 427-430, 2009.

DI SOTTO, A.; DURAZZI, F.; SARPIETRO M. G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and antioxidant activities of some bioflavours from wine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 141–146, 2013.

DORLA, E.; BIALECKI, A.; DEUSCHER, Z.; ALLIBERT, A.; GRONDIN, I.; DEGUINE, J. P.; LAURENT, P. Insecticidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Peperomia borbonensis* Miq. (Piperaceae) and Its Major Components against the Melon Fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Chemistry & biodiversity**, 14, 2017.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, 198: 16-32, 2013.

DUTRA, Q. P.; CHRIST, J. A.; CARRIJO, T. T.; ALVES, T. A.; ALVES, T. A.; MENDES, L. A.; PRAÇA-FONTES, M. M. Phytocytotoxicity of volatile constituents of essential oils from *Sparattanthelium* Mart. species (Hernandiaceae). **Scientific Reports**, 10, n. 12213, 2020.

DOS SANTOS, A. T. B.; JUNIOR, J. S. Z.; PARREIRA, L. A.; ABREU, K. M. P.; BERNARDES, C. O.; CARVALHO, J. R.; MENINI, L. Chemical identification and insecticidal effect of *Tephrosia vogelii* essential oil against *Cerosipha forbesi* in strawberry crop. **Crop Protection**, vol. 139, 2021. doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105405

ECONOMOS, C.; CLAY, W. D. Nutritional and health benefits of *citrus* fruits. **Food Nutr Agricult**, 24:11-8, 1999.

ESTEVAM, E. B. B.; MIRANDA, M. L. D.; ALVES, J. M.; EGEA, M. B.; PEREIRA, P. S.; MARTINS, C. H. G.; ESPERANDIM, V. R.; MAGALHÃES, L. G.; BOLELA, A. C.; CAZAL, C. M.; SOUZA, A. F.; ALVES, C. C. F. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). **Revista Virtual de Química**, p. 1842-1854, 2016.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, São Paulo-SP, v. 39, p. 120-130, 2017.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, D. S. V.; GUIMARAES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 445– 450, 2008.

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. In Cristofre, Martin, C. Environmental Genomic Totowa, NJ: **Humana Press**, v. 410, p. 185-216, 2008.

FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, 72, 1680-1686, 2009.

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

FIGUEIRA, A. C. G. Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do óleo essencial da *Lantana camara* (cambará). **Dissertação – (Genética)**, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - GO, 84 f., 2017.

FIGUEREDO, C. A. D; GURGEL, I. G. D; JUNIOR, G. D. G. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, p. 381-400, 2014.

FILHO, R. S.; VICARI, T.; SANTOS, S. A.; FELISBINO, K.; MATTOSO, N.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, p. 425-435, 2019.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

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

FRENZKE, L.; SCHEIRIS, E.; PINO, G.; SYMMANK, L.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; WANKE, S.; SAMAIN, M. S. A revised infrageneric classification of the genus *Peperomia* Ruiz & Pav. (Piperaceae). **Taxon**, v. 64, p. 424-444, 2015.

GALTER, I. N.; DUARTE, I. D.; MALINI, M.; ARAGÃO, F. B.; MARTINS, I. O.; ROCHA, L. D.; CARNEIRO, M. T. W. D.; SANTO, K. S. E.; DAVID, J. A. O.; MATSUMOTO, S. T. Water assessment of the Itapemirim River/Espírito Santo (Brazil): abiotic and toxicogenetic aspects. **Environ Sci Pollut Res**, 28: 10175-10191, 2020.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 454-461, 2010.

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

GHELLER, A. C. G. V.; KERKHOFF, J.; JÚNIOR, G. M. V.; CAMPOS, K. E.; SUGUI, M. M. Antimutagenic Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Aqueous Extract on Rats Treated with Monosodium Glutamate. **Scientific World Journal**, p. 1-8, 2017.

GRAÑA, E.; SOLETO, T.; DÍAZ-TIELAS, C.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants. *Weed Sci*, 61: 469-481, 2013.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, p. 11-16, 2010.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. Piperaceae neotropical. In: Milliken, W., Klitgard, B. & Baracat, A. (2009 em diante), Neotropikey – Recursos de Informação e chave interativa para plantas com flores dos neotrópicos.

GULFISHAN, M.; KHAN, A. H.; JAFRI, I. F.; BHAT, T. A. Assessment of mutagenicity induced by MMS and DES in *Capsicum annuum* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 19:251–255, 2012.

GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochem Ver**, 15, 1009-1033, 2016.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidade e aspectos básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFRGS, 1104p, 1999.

HETHELYI, E.B.; BERTALAN, G.; SZABOLCS, S. GC-MS Study of essential oils from *Perilla frutescens* chemotaxones grown in Mikkeli and phase microextraction (SPME)-GC-MS study of the herb. **Olaj. Szappan. Kozmetika.**, v. 58, p. 61-67, 2009.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.715-720, 2001.

IZZO, A. A.; ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. **Drugs**, v.61, p.2163-2175, 2001.

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

JARDIM, A. B.; TORRES, D. S. C.; DE OLIVEIRA, R. P.; GIULIETTI, A. M. M. Flora of Bahia: Costaceae. SITIENTIBUS série Ciências Biológicas, 16, 2016.

JEMÂA, J. M. B.; TERSIM, N.; TOUDERT, K. T.; KHOUJA, M. L. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 97-104, 2012.

JESUS, S. C. P.; MENDONÇA, F. A. C.; MOREIRA, J. O. T. Atividade inseticida e modos de ação de extratos vegetais sobre mosca branca (*Bemisia tabaci*). **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 6, p. 117-134, 2013.

JING, C.; ZHAO, J.; HAN, X.; HUANG, R.; CAI, D.; ZHANG, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Prot.**, 104, 41-46, 2018.

JONGEDIJK, E.; CANKAR, K.; BUCHHAUPT, M.; SCHRADER, J.; BOUWMEESTER, H.; BEEKWILDER, J. Biotechnological production of limonene in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2927-2938, 2016.

JORGE, M. M. P. **Avaliação da fitotoxicidade de compostos orgânicos e da desintegração de materiais: contributo para aferição das normas técnicas: EN 16086-1 e ISO 20200.** Dissertação – (Engenharia do Ambiente), Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 105 f., 2018.

JUN, M.; JEONG, W. S.; HO, C. T. Health Promoting Properties of Natural Flavor Substances. **Food Science and Biotechnology**, v. 15, p. 329-335, 2006.

JUNIOR, F. M. S.; VELOZO, L. S. M.; CARVALHO, E. M.; MARQUES, A. M.; BORGES, R. M.; TRINDADE, A. P. F.; SANTOS, M. I. S.; ALBUQUERQUE, A. C. F.; COSTA, F. L. P.; KAPLAN, A. C.; AMORIM, M. B. 3-Ishwarone, a Rare Ishwarane Sesquiterpene from *Peperomia scandens* Ruiz & Pavon: Structural Elucidation through a Joint Experimental and Theoretical Study. **Molecules**, v. 18, 13520–13529, 2013.

KAINA, B.; AURICH, O. Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. **Mutation Research**. v. 149, 451-461. 1985.

KAINA, B. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. **Cytogenetic Genome Research**. v. 104, p.77-86. 2004.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and Evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, p. 529-538, 2007.

KOSTIC, I.; PETROVIC, O.; MILANOVIC, S.; POPOVIC, Z.; STANKOVIC, S.; TODOROVIC, G.; KOSTIC, M. Biological activity of essential oils of *Athamanta haynaldii* and *Myristica fragrans* to gypsy moth larvae. **Industrial Crops Products**, v.41, p.17-20, 2013.

KRINSKI, D. et. al; Chemical composition and nymphicidal effect of essential oils from fruits for four *Piper* species (Piperaceae) against *Tibracalim bativentris* nymphs (Hemiptera: Pentatomidae). In: Embrapa Arroz e Feijão-resumo em anais de congress (ALICE). In: Congresso brasileiro latino –americano de entomologia, Maceió. Anais. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*.** Dissertação – (Qualidade Ambiental), Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo-RS, 58 f., 2009.

KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; FLORES, F. C.; DA SILVA, C. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia**: 68, 37–41, 2015.

LAGO, J. H. G.; DE OLIVEIRA, A.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J. 3-ishwarone and 3-ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* hensch. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 18, 638- 642, 2007.

LATIF, S.; CHIAPUSIO, G.; WESTON, L. A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. *Advances in Botanical Research. Academic Press*, v. 82, s/n, p.19-54, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 1995.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p. 214–219, 2008.

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

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

LI, N.; WU, J.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; BAI, L.; WANG, L.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 998-1001, 2007.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 118, p. 38-42. 2015.

LIU, Y.; ZHANG, A.; MA, X.; WANG, X. Genotoxicity evaluation of surface waters located in urban area of Xi'an City using *Vicia faba* bioassays. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**. v. 7, p. 860-866, 2013.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutat Res**, v. 350, p. 287-293, 1996.

LOPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; FLAUSINO, O.; BOLZANI, V. D.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresour. Technol.** 101, 4251-4260, 2010.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras: 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1130p, 2008.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J. M.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, 63: 647-651, 2008.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p. 176- 177, 1962.

MAHDIEH, M.; TALEBI, S. M.; AKHANI, M. Intraspecific essential oil and anatomical variations of *Salvia nemorosa* L. (Labiatae) populations in Iran. **Industrial Crops & Products**, 123, 35-45, 2018.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BARRIOS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. H. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of natural products**, v. 58(2), p. 324-328, 1995.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. D. S.; MATSUMOTO, S. T. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using *in vivo* and *in vitro* test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 176–181, 2010.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José Do Rio Preto/SP**. 208 f. Tese (Doutorado em Genética) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

MAURO, M. O.; PESARINI, J. R.; MARIN-MORALES, M. A.; MONREAL, M. T. F. D.; MONREAL, A. C. D.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, R. J. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 4808-4819, 2014.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDIER, I.; KIRSCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATHIEU, G.; VERGARA-RODRIGUEZ, D.; KRÖMER, T.; KARGER, D. N. *Peperomia* (Piperaceae) novelties from Veracruz State, Mexico. *Phytotaxa*, v. 205(4), p. 268-276, 2015.

MATHIEU, G. Taxonomic Repertory of the Genus *Peperomia* 2001-2020. Disponível em: <<http://www.peperomia.net>> Acesso em: out. 2020.

MBAH, J. A.; NGEMENYA, M. N.; ABAWAH, A. L.; BABIAKA, S. B.; NUBED, L. N.; NYONGBELA, K. D.; EFANGE, S. M. Bioassayguided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 11, p. 10, 2012.

MCHUGH, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica**, v. 21, p. 203–209, 2011.

MENDES, K. F.; ALMEIDA, C. S.; INOUE, M. H.; MERTENS, T. B.; TORNISIELO, L. Impacto do biochar no comportamento de herbicidas em solos: um enfoque no Brasil. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, p. 106-117, 2018.

MELO, A; GUIMARÃES, E. F.; ALVES, M. Sinopse do gênero *Peperomia* Ruiz & Pav. (Piperaceae) no Estado de Roraima, Brasil. *Hoehnea* 43: 119-134, 2016.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional de Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). **Rodriguésia**, 161-195, 2008.

MORA, F.; VELASCO, J.; DÍAZ, T.; ROJAS, L.; DE TORRES, L; RÍOS, N.; CARMONA, J. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes venezolanos. **Revista Peruana de Biología**, 23, 301-304, 2016.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A. Allelopathy and allelochemicals. In: SAMPIETRO, D. A.; CATALAN, C. A. N.; VATTUONE, M. A. (Eds.). Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. USA, **Science Publishers**, p. 3-5, 2009.

NASCIMENTO, C.; PONTES, E. D. S.; ALVES, M. E. F.; SOUZA, M. L. A.; SILVA, E. C. A.; DANTAS, C. M. G.; COSTA, T. A. M.; SILVA, E. C. A. Regulamentação e Consumo de Fitoterápicos no Brasil como Prática Complementar de Saúde. **International Journal of Nutrology**, v. 11, p. 67-74, 2018.

NATARAJAN, A. T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 225–229, 1993.

NERIO, L.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellency activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.212–214, 2009.

NGASSAPA, O. D.; RUNYORO, D. K. B.; VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; CHINOU, I. B. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Geniosporum rotundifolium* Briq and *Haumaniastrum villosum* (Bene) AJ Paton (Lamiaceae) Essential Oils from Tanzania. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 107-113, 2016.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM, Z.P.H.; MATHUR, S.B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 329-340, 2004.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Database 69. NIST Chemistry WebBook, 2011.

NORDIN, M. A. F.; HARUN, W. H. A. W.; RAZAK, F. A.; MUSA, M. Y. Growth inhibitory response and ultrastructural modification of oral-associated candidal reference strains (ATCC) by *Piper betle* L. extract. **Int. J. Oral Sci.**, 6: 15-21, 2014.

OKOH, S. O.; IWERIEBOR, B. C.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Bioactive Constituents, Radical Scavenging, and Antibacterial Properties of the Leaves and Stem Essential Oils from *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, 13:S392-400, 2017.

OLIVEIRA, S.C.C.; GUALTIERI, S. C. J.; DOMÍNGUEZ, F. A. M.; MOLINILLO, J. M. G.; MONTOYA, R. V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p.607-618, 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; PEREIRA, K. C. L.; MULLER, J. A. I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, 32: 41-47, 2014.

OLIVEIRA, J. T. D. **Avaliação in vitro da mutagenicidade e antimutagenicidade do fármaco digoxina**. Dissertação – (Ciências da Saúde), Universidade Federal de São João Del-Rei, 105 f., 2016.

PALMIERI, M. J. (2012). **Análise comparativa do efeito citotóxico do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes fracionais em células vegetais e humanas**, **Dissertação** (Mestrado – Genética e Melhoramento de plantas), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG.

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TRENTO, M. V. C.; EULTÉRIO, M. W. F.; LUBER, J.; DAVIDE, L. C.; MARCUSSI, S. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollution**, 227:156–166, 2016.

PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; ... & SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138(2), p. 479- 486, 2011.

PINHEIRO, P. F.; COSTA, A. V.; ALVES, T. A.; GALTER, I. N.; PINHEIRO, C. A.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. M. R.; PRAÇA-FONTES, M. M. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, p. 8981-8990, 2015.

Piperaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12613>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

PIRES, N. D. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: DE OLIVEIRA, J. R, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. Biologia e manejo de plantas daninhas, 2011.

QIAN, H. et al. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 75, p. 368-375, 2009.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v.29, p.913-920, 2010.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput., Viena. 2016.

REIGADA, J. B. Bioprospecção em espécies de Piperaceae. 2009. 133 f. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** 18(5): 577-608, 1999.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 629-646, 2013.

RIBEIRO, L. R.; BELO, G. A.; MONTEIRO, A. B. Avaliação da atividade citogenotóxica e antimutagênica do extrato aquoso de *Bidens pilosa*. *Conexão Ci.* v. 13, p. 15-22, 2018.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental toxicology and water quality**, v. 12, p. 283-294, 1997.

Rice, E. L. Allelopathy. Academic press. 2nd edition, 368 p. 2012.

RIVERA, P. N.; MOSQUERA, T.; BALDISSEROTTO, A.; ABAD, J.; AILLON, C.; CABEZAS, D.; PIEDRA, J.; CORONEL, I.; MANFREDINI, S. Chemical Composition and *in-vitro* biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, p. 29-31, 2015.

ROBAYO-GAMA, P. A.; QUIJANO, C. E.; MORALES, G.; PINO, J. A. Composition of the Essential Oil From Leaves of *Peperomia galioides* HBK Grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 22, 307-309, 2010.

RUSSEL, P. J. **Chromosomal mutations**. In CUMMINGS, B. (Ed.). Genetics. San Francisco: Pearson Education, Chap. 35, p. 595-621, 2002.

SADGROVE, N.; JONES, G. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. **Agriculture**, v.5, p. 48-102, 2015.

SAMPIETRO, D. A. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. (linea). Fac. de Bioquím., Quím. y Farm. Un. Nac. de Tucumán, Arg. <<http://www.mdp.edu.ar/illia/nueva/alelopatia/alelopatia>>, 2001. acessado em 25 de maio de 2017.

SANTOS, N. C. N. D. Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos. **Tese** – (Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 94 f., 2015.

SANTOS, E. S.; VASCONCELOS, L. C.; PRAÇA-FONTES, M. M. Efeito do óleo essencial de cultivar de *Psidium guajava* L. sobre a germinação e crescimento de alface e sorgo. XXVIII Semana Agronômica, 2017.

SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S. S.; SILVEIRA, G. L.; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. DAS G.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 26, 2019.

SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* Link var. *circinnata*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 312-314, 1999.

SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum* Meyer. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 477-480, 2010.

SILVA, J. K. R.; PINTO, L. C.; BURBANO, M. R. M.; MONTENEGRO, R. C.; GUIMARÃES, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. C. S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

SILVA, M. R.; FARIAS, P. M. O óleo essencial de Pimenta racemosa é eficiente inseticida para controle de *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) em grãos armazenados. **PESQ. AGROP. GAÚCHA**, v.26, p. 7-17, 2020.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**. v. 178, p. 359–367, 2017.

SILVESTRE, D. M.; KOLB, R. M.; FREI, F.; SANTOS, C. Phytotoxicity of organic extracts of *Turnera ulmifolia* L. and *Turnera diffusa* Willd.ex Schult. in cucumber seeds. **Acta Botanica Brasílica**, v. 27, n. 3, p. 476-482, 2013.

SŁOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of applied genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. Capítulo 18. *In*: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. (eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editoras da UFRGS/UFSC. 1102p, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1104 p., 2007.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVIK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Editora UFRGS. Porto Alegre, 2010.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of extracted from some medicinal plants on differen mycotogenic fungi, **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1669-1675, 2003.

SOLTYS, D.; RUDZIŃSKA-LANGWALD, A.; KUREK, W.; GNIAZDOWSKA, A.; SLIWINSKA, E.; BOGATEK, R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. **Planta**, 234(3): 609-21, 2011.

SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233-2252, 2011.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fireant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical entomology**, v. 41, p. 510-517, 2012.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; VASCONCELOS, M. A. M.; ZOGHBI, M. G. B., CUNHA, R. L., Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Revista Acta amazônica**, v. 39, p.389- 396, 2009.

SOUZA, J. I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Rev. Biotemas**, v. 22, p. 77-83, 2009.

SOUZA, T. S.; FERREIRA, M. F. S.; MENINI, L.; SOUZA, J. R. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. R.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Sci. Hortic.** 216, 38–44, 2017.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Disponível em: <<http://goo.gl/S8Oh1O>>. Acesso em: 16 agosto 2017.

TABAN, A.; SAHARKHIZ, M. J.; HADIAN, J. Allelopathic potential of essential oils from four *Satureja* spp. **Biological agriculture & horticulture**, 29(4), 244-257. (2013).

TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; AGUIAR, A. R.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. **Enciclopédia Biosfera** - Centro Científico Conhecer - v.14, p. 814, 2012.

TORRES-PELAYO, V. R.; FERNANDEZ, M. S.; CARMOSA-HERNANDEZ, O.; MOLINA-TORRES, J.; LOZADA-GARCIA, A.; A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus *Piper*: as a potent bio-insecticide. **Research & Reviews: Research Journal of Biology**, v. 4, p. 45-51, 2016.

TU, N. T.; ONISHI, Y.; CHOI, H. S.; KONDO, Y.; BASSORE, S. M.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Y. Characteristic Odor Components of *Citrus sphaerocarpa* Tanaka (Kabosu) Cold-Pressed Peel Oil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, p. 2908-2913, 2002.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines**. OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, EPA 712-C-96-154, 2012.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M.; Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science Total Environment**, v. 378, p. 63–66, 2007.

VASCONCELOS, L. C.; SANTOS, E. S.; BERNARDES, C. O.; FERREIRA, M. F. S.; FERREIRA, A.; TULER, A. C.; CARVALHO, J. A. M.; PINHEIRO, P. F.; PRAÇA-FONTES, M. M., Phytochemical analysis and effect of the essential oil of *Psidium* L. species on the initial development and mitotic activity of plants. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 26, 26216-26228, 2019.

VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia*, v. 80(2), p. 119-122, 2009.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic Damage in Shallot (*Allium cepa*) Root Meristems Induced by Oil Industry “High-Density Brines”. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284-291, 2002.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; GOSWANI, P.; CHAUHAN, A. Essential oil composition of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth from India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, p. 89–95, 2015.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. Química Orgânica. 6. ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2013.

WANG, Q. W.; YU, D. H.; LIN, M. G.; ZHAO, M.; ZHU, W. J.; LU, Q.; LI, G. X.; WANG, C.; YANG, Y. F.; QIN, X. M.; FANG, C.; CHEN, H. Z.; YANG, G. H. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Molecules**, v. 17, p. 4474-4483, 2012.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). *Plant Biology*, v. 8(1), p. 93-102, 2006.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales–*matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 477–497, 2007.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and dna repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. **Chem. Res. Toxicol.** 19:1580-1594, 2006.

YAKUBU, I.; AMINU, S. A.; ABDLLAHI, M. Influence of Allelochemicals Substances in *Eucalyptus* Species on Agricultural Crops: A Review. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v.5, n.5, p. 25-32, 2018.

YAN, Z. Q.; WANG, D. D.; DING, L.; CUI, H. Y.; JIN, H.; YANG, X. Y.; QIN, B. Mechanism of artemisinin phytotoxicity action: Induction of reactive oxygen species and cell death in lettuce seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, 88(s/n), 53-59, 2015.

YANG, C. H.; TAN, D. H.; HSU, W. L.; JONG, T. T.; WEN, C. L.; HSU, S. L.; CHANG, P. C. Anti-influenza virus activity of the ethanolic extract from *Peperomia sui*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155(1), p. 320-325, 2014.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, 76, 182-186, 2012.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

ZHENG, G.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.

ZHU, W. L., MENGGAN; YANG, GUOHONG; WANG, QIWEI; YANG, YIFANG. Structure identification of two polyketide isomers in ethanol extract from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi**, vol. 42, 504 - 507, 2011.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CANHOTO, J.; VALE-SILVA, L.; SILVA, M. J.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.612-618, 2011.