

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

LOREN CRISTINA VASCONCELOS

**EFEITO ALELOPÁTICO DE *Myrcia vittoriana* Kiaersk.
(MYRTACEAE)**

ALEGRE-ES

2020

LOREN CRISTINA VASCONCELOS

**EFEITO ALELOPÁTICO DE *Myrcia vittoriana* Kiaersk.
(MYRTACEAE)**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça
Fontes.

Coorientador: Prof. Dr. Mário Luís Garbin.

ALEGRE-ES

2020

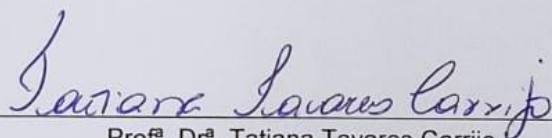
LOREN CRISTINA VASCONCELOS

**EFEITO ALELOPÁTICO DE *Myrcia vittoriana* Kiaersk.
(MYRTACEAE)**

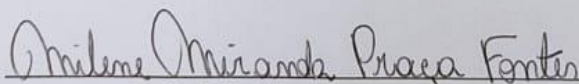
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020.

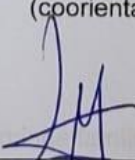
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo
(orientadora)



Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo
(coorientadora)



Prof^o. Dr^o. Luciano Menini
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Espírito Santo
(membro externo)

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

V331e Vasconcelos, Loren Cristina, 1995-
Efeito alelopático de *Myrcia vittoriana* Kiaersk.
(Myrtaceae). / Loren Cristina Vasconcelos. - 2020.
73 f. : il.

Orientadora: Tatiana Tavares Carrijo.

Coorientadores: Milene Miranda Praça Fontes, Mário Luís
Garbin.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Alelopatia. 2. Bioensaios vegetais. 3. Mutagênese. 4.
Myrcia vittoriana. 5. Floresta Atlântica. I. Carrijo, Tatiana
Tavares. II. Fontes, Milene Miranda Praça. III. Garbin, Mário
Luís. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523

À minha mãe, namorado e minha família, em especial ao meu avô Geraldo Francisco de Vasconcelos (*in memoriam*) que sempre me motivou com seu amor e bom humor.

Dedico

“Nada é tão nosso quanto nossos sonhos.”

(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me oferecer conforto e refúgio em cada momento difícil que me fez desanimar ou querer desistir.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGGM) pela oportunidade de aprendizado e realização dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES, pelo apoio financeiro deste trabalho.

À minha mãe Deriana pelo amor incondicional e por ser tão maravilhosa, colocando sempre as minhas necessidades e da minha irmã acima das dela, fazendo quase o impossível para nos ver felizes.

À minha irmã, Giselly, e ao meu tio, Rudney, por estarem sempre comigo, por todas as brincadeiras e gargalhadas. Quero agradecer também ao meu avô, Geraldo Francisco (*in memoriam*), por construir esse sonho comigo desde minha adolescência, obrigada por cada momento que pude viver ao seu lado e por zelar por mim aí do céu.

Ao meu namorado, Matheus, pelo apoio incondicional e por encher minha vida de cor e amor. Sem dúvidas, sem você, trilhar esse caminho seria mais difícil. Também agradeço minha sogra Euzimar pelas orações e pela torcida por mim.

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenética, Mutagênese e Cultura de Tecidos Vegetais, Cristiana, Micheli, Alda, João Paulo, Maria Eliza, Íris, Lara, Thammyres, Aline, Adeilson e Soninha pelos momentos compartilhados.

À Alda e Soninha pelo apoio e incentivo durante esses últimos meses de bancada, a alegria e o incentivo de vocês foram fundamentais nessa última etapa.

Aos colegas do Laboratório de Botânica, em especial, Amélia pela ajuda em campo e Rennan pelos gráficos maravilhosos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo e coorientadora Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho e por todo conhecimento transmitido.

Ao Prof^o. Dr^o. Mário Luis Garbin pela orientação e ajuda com as análises estatísticas.

Ao Laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) campus de Alegre pelo apoio técnico e suporte nas análises químicas realizadas nesse trabalho, em especial ao Prof^o. Dr^o. Luciano Menini, a técnica Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima e ao MSc. Aldino Neto Venâncio.

Aos professores, Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo, Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes e Dr^o. Luciano Menini por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa desta dissertação, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho, ao compartilharem seus conhecimentos científicos.

Aos demais professores que tive ao longo da graduação e mestrado que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Loren Cristina Vasconcelos, filha de Deriana da Silva Vasconcelos e Luiz Carlos Lazarini, natural de Bom Jesus do Itabapoana – RJ, nascida em 12 de outubro de 1995. Concluiu o Ensino Médio em 2012, no Centro Estadual de Ensino fundamental e Médio em Tempo Integral Francisco Coelho Ávila Júnior, em Cachoeiro de Itapemirim – ES. Em outubro de 2013 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, campus de Alegre – ES, graduando-se em Ciências Biológicas Licenciatura em dezembro de 2017. Durante a graduação foi bolsista de PIBIC tendo desenvolvido atividades na área de mutagênese, genética e monitoria na disciplina de Zoologia. Em março de 2018 deu início ao Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, na linha de pesquisa de Biologia Evolutiva e Citogenética, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo e coorientação da Profa. Milene Miranda Praça-Fontes e do Dr^o. Prof^o. Mário Luís Garbin, submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2020.

RESUMO

VASCONCELOS, Loren Cristina. **Efeito alelopático de *Myrcia vittoriana* Kiaersk. (Myrtaceae)**. 2019. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Tavares Carrijo. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes. Coorientador: Prof^o. Dr^o. Mário Luís Garbin.

Myrcia vittoriana é uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, encontrada em formações de restinga e de floresta ombrófila. Um estudo recente sugeriu que essa espécie poderia apresentar atividade alelopática sobre outras espécies em uma comunidade vegetal de Restinga, considerando seu padrão de distribuição espacial nas moitas de vegetação. Neste estudo, avaliamos o efeito alelopático do óleo essencial, extrato aquoso e etanólico das folhas de *M. vittoriana* na germinação, desenvolvimento inicial e ciclo celular dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa* L. (cebola). O óleo essencial e os extratos aquoso e etanólico de *M. vittoriana* foram caracterizados e utilizados como tratamentos nos ensaios de fitotoxicidade e citotoxicidade. Foi observado a redução dos parâmetros germinativos e do crescimento das plantas modelos, sendo os efeitos mais evidentes provocados pelas maiores concentrações, 100 (% v/v) para os extratos e 3000 µg mL⁻¹ para o óleo essencial. O ciclo celular também foi afetado pela redução do índice mitótico e pela presença de alterações cromossômicas e nucleares. Todos os tratamentos apresentaram modos de ação clastogênico e aneugênico. Os resultados podem ser associados ao efeito sinérgico dos metabólitos encontrados nos extratos e no óleo essencial, principalmente pela presença do sesquiterpeno germacreno D no óleo essencial, e de catequinas, saponinas e taninos encontrados nos extratos. Todas essas substâncias são relatadas pela capacidade de inibir a germinação e o crescimento de espécies de plantas. Os dados encontrados apontam para a confirmação do efeito alelopático de *M. vittoriana*.

Palavras-chave: Bioensaios vegetais, Fitotoxicidade, Floresta Atlântica, *Gomidesia martiana* O. Berg.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Loren Cristina. **Allelopathic effect of *Myrcia vittoriana* Kiaersk. (Myrtaceae)**. 2019. Dissertation (Master in Genetics and Improvement). Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Advisor: Prof. Dr. Tatiana Tavares Carrijo. Coordinator: Prof. Dr. Milene Miranda Square Fountains. Coordinator: Prof. Dr. Mario Luis Garbin.

Myrcia vittoriana is an endemic species of the Atlantic Forest, found in sandbank and ombrophilous forest formations. A recent study suggested that this species could show allelopathic activity over other species in a plant community in Restinga, considering its spatial distribution pattern in vegetation clumps. In this study, we evaluated the allelopathic effect of the essential oil, aqueous and ethanolic extract of *M. vittoriana* leaves on germination, initial development and cell cycle of the plant models *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Allium cepa* L. (onion). The essential oil and the aqueous and ethanolic extracts of *M. vittoriana* were characterized and used as treatments in phytotoxicity and cytotoxicity tests. The reduction of germinative parameters and growth of model plants was observed, with the most evident effects caused by the highest concentrations, 100 (% v / v) for extracts and 3000 µg mL⁻¹ for essential oil. The cell cycle was also affected by the reduction of the mitotic index and the presence of chromosomal and nuclear changes. All treatments showed clastogenic and aneugenic modes of action. The results can be associated with the synergistic effect of the metabolites found in the extracts and in the essential oil, mainly by the presence of the sesquiterpene germacrene D in the essential oil, and of catechins, saponins and tannins found in the extracts. All of these substances are reported for their ability to inhibit the germination and growth of plant species. The data found point to the confirmation of the allelopathic effect of *M. vittoriana*.

Keywords: Atlantic Forest, *Gomidesia martiana* O. Berg., Phytotoxicity, Plant bioassays.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécie *Myrcia vittoriana* Kiaersk. a e b: Aspecto em campo da espécie. c – e: detalhes do fruto. 20
- Figura 2.** Estrutura molecular dos compostos identificados no óleo essencial de *Myrcia vittoriana*. 1) δ -Elemeno; 2) (E)-Cariofileno; 3) α -Santaleno; 4) α -Bergamoteno; 6) Germacreno D; 7) Bicyclogermacreno; 9) γ -Muuroleno; 10) δ -Cadineno; 11) Germacreno B; 15) Epi- α -Cadinol..... 29
- Figura 3.** Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Myrcia vittoriana*. 1) δ -Elemeno; 2) (E)-Cariofileno; 3) α -Santaleno; 4) α -Bergamoteno; 6) Germacreno D; 7) Bicyclogermacreno; 9) γ -Muuroleno; 10) δ -Cadineno; 11) Germacreno B; 15) Epi- α -Cadinol..... 30
- Figura 4.** Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* na germinação de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média. 36
- Figura 5.** Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média. 37
- Figura 6.** Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no crescimento radicular de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias

nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média. 38

Figura 7. Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média. 39

Figura 8. Efeito do óleo essencial de *Myrcia vittoriana* ($3000 \mu\text{g mL}^{-1}$) no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*. a: Plântulas tratadas com água destilada apresentando aspecto e coloração normais. b: Plântulas tratadas com a concentração $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial apresentando coloração amarelada, raízes escuras e manchas escuras na parte aérea. 40

Figura 9. Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas ao óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *Myrcia vittoriana*. a) metáfase com aderência cromossômica, b) interfase com micronúcleo, c) c-metáfase, d) ponte cromossômica..... 45

Figura 10. Distribuição das alterações cromossômicas e micronúcleo (MNC) observados no ciclo celular de células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* (a) e *Allium cepa* (b) expostas ao óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *Myrcia vittoriana*. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química e área relativa (%) dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de <i>Myrcia vittoriana</i>	27
Tabela 2. Classes de metabólitos secundários encontrados no extrato aquoso e extrato etanólico de <i>Myrcia vittoriana</i>	31
Tabela 3. Parâmetros macroscópicos avaliados em <i>Lactuca sativa</i> tratada com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de <i>Myrcia vittoriana</i>	34
Tabela 4. Parâmetros macroscópicos avaliados em <i>Allium cepa</i> tratada com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de <i>Myrcia vittoriana</i>	35
Tabela 5. Análise de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de <i>Myrcia vittoriana</i>	43
Tabela 6. Análise de células meristemáticas de <i>Lactuca sativa</i> tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de <i>Myrcia vittoriana</i>	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Material vegetal	19
2.2 Extração e rendimento do óleo essencial	19
2.3. Caracterização química do óleo essencial.....	21
2.4. Obtenção dos extratos foliares	23
2.5. Rastreio fitoquímico dos extratos.....	23
2.6. Exposição das plantas ao óleo essencial e extratos.....	23
2.7. Análise macroscópica	24
2.8. Análise microscópica	25
2.9. Análise estatística	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Rendimento e caracterização química do óleo essencial	27
3.2. Rastreio fitoquímico dos extratos.....	31
3.3. Efeitos macroscópicos	32
3.4. Efeitos microscópicos	40
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

As plantas interagem de diversas maneiras em busca de recursos ambientais, podendo dificultar ou facilitar o estabelecimento de espécies vizinhas (Inderjit, 2005). Nesse cenário, muitas das vezes são utilizadas estratégias bioquímicas a partir da biossíntese de produtos naturais, como a alelopatia (Reigosa et al., 1999; Wang et al., 2011). A alelopatia é uma forma de interferência, geralmente associada à influência negativa de uma planta sobre o crescimento e desenvolvimento de outras plantas através de biomoléculas (aleloquímicos) liberadas no ambiente (Molish, 1937; Rice, 1979; Zimdahl, 2018). Produto do metabolismo especializado, esses compostos são emitidos através de lixiviação de partes aéreas, exsudação radicular, volatilização ou por resíduos de plantas em decomposição (Rice, 1984; Weir et al., 2004), afetando vários processos fisiológicos (fotossíntese, absorção de nutrientes, divisão celular ou alongamento) de outras plantas (Inderjit e Duke, 2003).

A alelopatia é um fenômeno natural e comum em comunidades de plantas de diferentes tipos de ecossistemas (Blanco, 2007; Smith, 1989). Os aleloquímicos apresentam papel importante no controle da diversidade de espécies podendo determinar a organização das comunidades naturais (Chou, 1999) através de alterações no padrão da vegetação e sucessão de plantas, além de favorecer a dominância de espécies introduzidas (Callaway and Ridenour, 2004; Fernandez et al., 2013; Kato-Noguchi et al., 2017). Neste sentido, a alelopatia tem demonstrado a relevância das interações químicas planta-planta para a modulação da estrutura e funcionamento das comunidades, antes limitados à competição por recursos através da remoção ou redução de fatores ambientais compartilhados no habitat (Inderjit et al., 2011; Tukey, 1969).

A família Myrtaceae Fig. dentre as principais famílias para as quais já foram reportadas espécies com comprovado efeito alelopático, sendo também uma das famílias com maior riqueza e abundância de espécies da flora brasileira (Mori et al., 1983). Estudos realizados em representantes do gênero *Myrcia*, demonstraram a capacidade das espécies deste gênero de afetarem o crescimento e o desenvolvimento de espécies consideradas indesejáveis em culturas agrícolas (Imatomi et al., 2015). Outras, como *M. bella* Cambess., *M. multiflora* DC., *M. splendens* DC (Imatomi et al., 2013a), *M. guianensis* (Aubl.) DC. (Franco et al., 2015; Souza Filho et al., 2006) e *M. tomentosa* DC. (Imatomi et al., 2013b), demonstraram efeitos fitotóxicos. Considerando que Myrtaceae é uma das famílias com maior riqueza de espécies nos diferentes biomas do Brasil, investigar o efeito alelopático em espécies nativas desta família pode ajudar a explicar a composição florística e a distribuição espacial de suas espécies em comunidades vegetais.

De acordo com Wardle (1987) a alelopatia pode ser confirmada através de evidências que mostrem que os compostos alelopáticos produzidos e liberados pela planta em estudo, foram absorvidos pelas espécies receptoras e provocaram efeitos inibitórios ou estimulantes no seu desenvolvimento. Em comunidades vegetais, as plantas podem interagir de forma negativa, positiva ou neutra, sendo mais comum a interação negativa, onde a emergência ou crescimento das plantas vizinhas são inibidos (Pires e Oliveira 2011).

O estudo realizado em moitas de vegetação de planícies costeiras arenosas (Restingas) na Floresta Atlântica (Garbin et al., 2016) revelou um padrão de ocupação espacial intrigante: em moitas de vegetação arbustiva com maior abundância de *M. vittoriana* Kiaersk. não se encontravam duas outras espécies de Angiospermas (*Erythroxylum subsessile* (Mart.) O.E.Schulz e *Myrsine parvifolia* A.DC.), comumente

encontradas em moitas com ausência de *M. vittoriana*. Por outro lado, a abundância de outra espécie de Myrtaceae (*Eugenia rotundifolia* Casar.) permanecia pouco alterada em moitas de vegetação com presença de *M. vittoriana*. Com base nos padrões espaciais observados para essas espécies, Garbin et al. (2016) sugeriram que, dentre outros fatores, *M. vittoriana* poderia estar exercendo efeito alelopático sobre *E. subsessile* e *M. parvifolia*, mas não sobre a outra espécie da mesma família. Testar o efeito alelopático de *M. vittoriana* pode lançar luz ao entendimento dos padrões de distribuição espacial registrados para essas espécies em seu ambiente natural de ocorrência, assim como de outras espécies nativas de Myrtaceae encontradas em sistemas tropicais. O primeiro passo para dar início a essa investigação, é testar o efeito alelopático dessas espécies em plantas modelo.

Neste cenário, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial alelopático do óleo essencial e dos extratos aquoso e etanólico de *M. vittoriana*, seus efeitos no desenvolvimento inicial (fitotoxicidade) e ciclo celular (citotoxicidade) nas plantas modelo *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. O estudo fitoquímico e a identificação de substâncias alelopáticas presentes no óleo essencial e nos extratos de *M. vittoriana* também foram realizados. Através da investigação do efeito das substâncias alelopáticas encontradas em *M. vittoriana* no ciclo celular de *L. sativa* e *A. cepa* foi possível explicar, a nível celular, as alterações morfológicas e fisiológicas encontradas e, desta forma, o modo de ação das substâncias presentes em *M. vittoriana*, explicando em parte como essa espécie pode estar atuando sobre suas vizinhas em comunidade de plantas nativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Folhas frescas de *M. vittoriana* foram coletadas em indivíduos de uma comunidade de Restinga da região Sudeste do Brasil (22° 23'S, 41°45' W, nível do mar), Brasil (Fig. 1). Em campo, foram coletadas pela manhã folhas saudáveis de 9 indivíduos distribuídos por três moitas (três indivíduos por moita), mesmos indivíduos do estudo de Garbin et al. (2016). As coordenadas de localização dessas moitas foram marcadas com a utilização de GPS. Parte das folhas coletadas foram secas em estufa a 40° durante um período de 72 horas e depois trituradas em pedaços pequenos para utilização no preparo dos extratos foliares. Os ensaios foram realizados com sementes de *L. sativa* (cultivar comercial Alface Grandes Lagos Americana, Isla sementes), uma eudicotiledônea, e de *A. cepa* (cultivar comercial Baia Periforme, Isla sementes), uma monocotiledônea.

2.2 Extração e rendimento do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído de folhas frescas de *M. vittoriana* por hidrodestilação usando o aparelho de Clevenger. Cerca de 420g do material vegetal recém picotado foram colocados com água destilada em um balão de fundo redondo de 5L equipado com um condensador de extração de óleo essencial. O conteúdo foi fervido por aproximadamente 4h. Após a hidrodestilação, o hidrolato (mistura de água e óleo) foi coletado através do bico do condensador e centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos para que houvesse separação entre as fases aquosa e oleosa. O óleo de cor amarelo claro (sobrenadante) foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur

e armazenado em frasco de vidro âmbar no congelador a temperaturas inferiores a 0°C (Pinheiro et al., 2013). O procedimento de extração foi repetido por 4 vezes. O rendimento foi calculado através da razão entre a massa do óleo extraído e a massa fresca da amostra (% v / m).

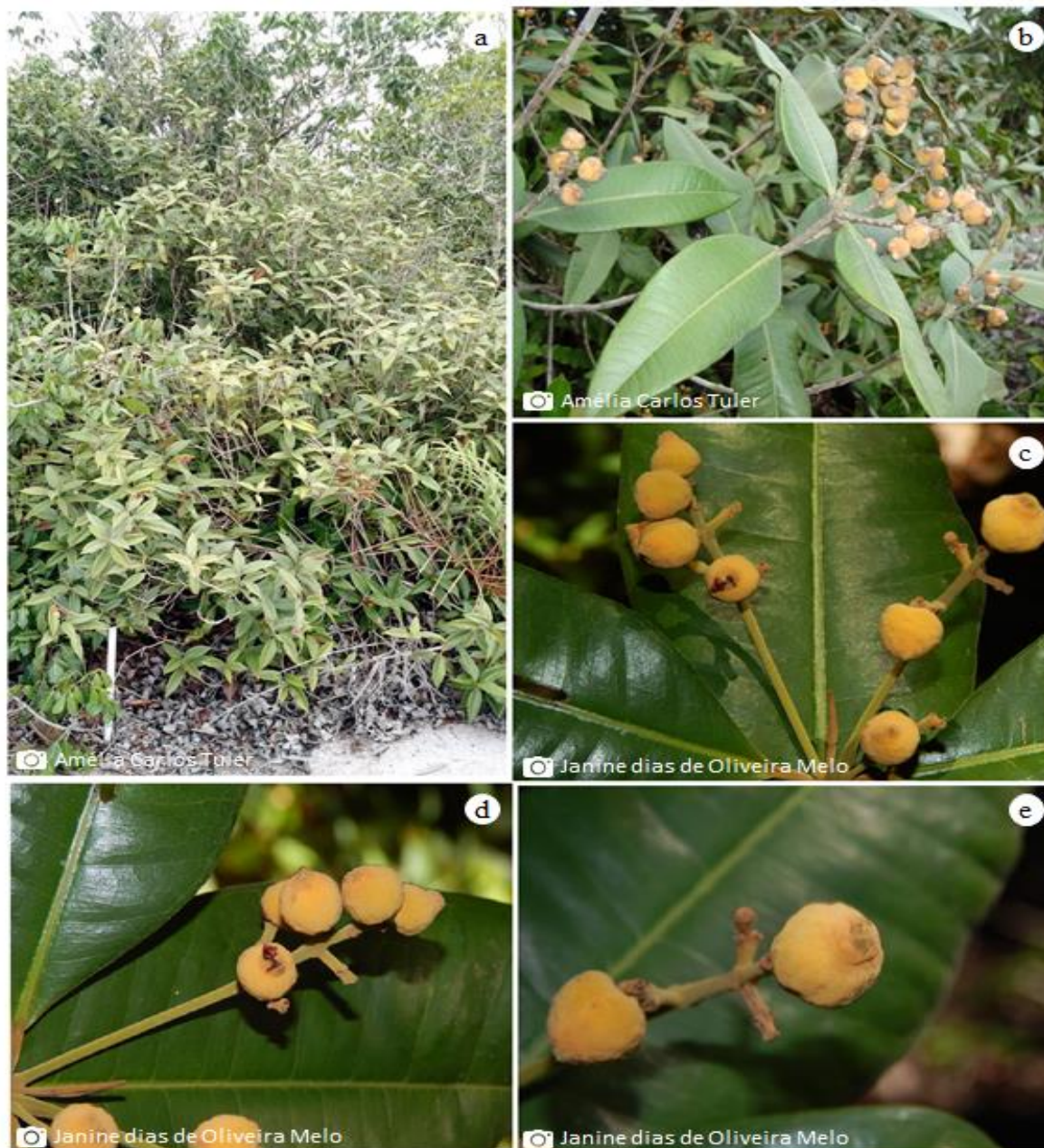


Figura 1. Espécie *Myrcia vittoriana* Kiaersk. a e b: Aspecto em campo da espécie. c – e: detalhes do fruto.

2.3. Caracterização química do óleo essencial

As amostras do óleo essencial das folhas de *M. vittoriana* foram analisadas 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 QPMS-2010) seguindo a metodologia adaptada de Souza et. al., (2017). Sendo empregadas em ambas as análises as seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25mm) com fase estacionária Rtx®-5MS (0,25 µm de espessura do filme); N₂ (em análise de GC/FID) e He (em análises de GC/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).

A identificação dos componentes químicos dos óleos foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados das espectrotecas Willey7, NIST05, NIST05s com a co-injeção de padrões e pelos Índices de retenção LTPRI. Para o cálculo dos Índices de LTPRI (Linear Temperature Programmed Retention Indexes), sendo utilizada uma mistura de n-alcanos lineares (C7 a C40). O Índice de LTPRI é um índice de retenção com programação linear de temperatura, e é utilizado quando a corrida cromatográfica é realizada com uma programação linear de temperatura (Muhlen, 2009). Este índice descreve o

comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de hidrocarbonetos lineares saturados de diferentes números de átomos de carbono. Fornecendo informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura sendo independente das condições experimentais. O LTPRI calculado (IR) para cada composto foi comparado com valores da literatura (Adams, 2007), sendo calculado através da equação:

$$IR = 100n + 100 \left\{ \frac{(t'_{Ri}) - (t'_{Rn})}{[(t'_{Rn+1}) - (t'_{Rn})]} \right\}$$

Fórmula usada para determinação do índice de LTPRI, onde:

i: é o composto de interesse;

n: é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de i;

t'_{Ri} : é o tempo de retenção ajustado;

t'_{Rn} : é o tempo de retenção ajustado;

t'_{Rn+1} : é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de i.

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral de seus respectivos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados estes obtidos pelas análises realizadas por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC/FID). Para definir a composição química dos óleos levou-se em consideração os compostos com área relativa superior a 1% para todos os óleos.

2.4. Obtenção dos extratos foliares

O extrato aquoso foi preparado com 30g de folhas secas colocadas em 300 mL de água destilada aquecida a 100°C. Após descanso de 10 minutos, o extrato foi filtrado. O extrato aquoso não foi concentrado. O extrato etanólico foi obtido a partir da mistura de 10g de folhas secas e 100 mL de álcool 70% em um shaker durante 72 horas. Após esse período, a solução foi filtrada e concentrada a vácuo em um evaporador rotatório até que atingisse metade do seu volume inicial.

2.5. Rastreo fitoquímico dos extratos

A triagem fitoquímica para determinar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos aquoso e etanólico das folhas de *M. vittoriana* foram determinados de acordo com a metodologia qualitativa descrita por Matos (2009) (para fenóis, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, antocianinas, antocinidinas, auronas, chalconas, flavonoides, xantonas, catequinas, esteroides, saponinas, ácidos fixos fortes, resinas e alcaloides), Joshi et al. (2013) (glicosídeo de antraquinona) e Ayoola et al. (2008) (glicosídeo cardíaco e terpenoides). A presença ou ausência desses metabólitos secundários foi apontada a partir da observação das reações realizadas que indicaram resultado positivo ou negativo para cada metabólito investigado (Bessa et al., 2014).

2.6. Exposição das plantas ao óleo essencial e extratos

Para realização dos ensaios vegetais, soluções do óleo essencial das folhas de *M. vittoriana* foram preparadas utilizando como solvente o diclorometano, obtendo-se as concentrações 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os extratos, aquoso e

etanólico, foram diluídos com água destilada e testados nas concentrações 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 (% v/v). O herbicida glifosato (1 mL/L). e o metanossulfonato de metila (MMS) (0,004 M) foram usados como controle positivo. O MMS é um agente alquilante do DNA utilizado como controle positivo em testes ciogenotóxicos (Mauro et al., 2014). O solvente diclorometano utilizado na preparação das soluções do óleo essencial também foi testado, porém apresentou resultados semelhantes estatisticamente ao controle água. Assim, a água destilada foi escolhida como controle negativo e os dados do solvente não foram mostrados. O delineamento experimental dos ensaios vegetais foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições para cada tratamento. Cada repetição correspondeu a uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 25 sementes. As sementes de *L. sativa* e *A. cepa* foram colocadas sobre papel filtro umedecido com 2 mL das soluções do óleo essencial e de cada extrato. As placas foram envoltas com plástico filme e incubadas em câmara de germinação (BOD) à $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo período experimental.

2.7. Análise macroscópica

Para a análise macroscópica o número de sementes germinadas foi avaliado de 8 às 48h, com 8h de intervalo para *L. sativa* e de 12 às 96h, com 12h de intervalo para *A. cepa*. Ao final desse período o índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula abaixo:

$$(N_1) \times 1 + (N_1 + N_2) \times 1/2 + (N_3 + N_2) \times 1/3 \dots (N_y - (N_{y-1})) \times 1/y$$

N_y = número de sementes germinadas em um dado período;

Y = número total de intervalos de tempo.

A porcentagem de germinação (G%) e o crescimento radicular (CR) de *L. sativa* foram obtidos após 48h. As 120h de exposição o crescimento aéreo (CA) foi mensurado (Pinheiro et al., 2015). Para *A. cepa* as variáveis G% e CR foram obtidas às 96h de exposição aos tratamentos. De acordo com Silveira et al. (2017) *A. cepa* tem como característica fisiológica o crescimento mais lento de suas plântulas em relação a *L. sativa*, não apresentando brotos verdes durante o período de 120h, diante disso a variável CA não foi avaliada. Todas as medições foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital.

2.8. Análise microscópica

Sementes de *L. sativa* e *A. cepa* foram submetidas às mesmas condições, soluções e controles testados nas análises macroscópicas por um período de 48h. Após esse período, raízes de três repetições foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e armazenadas a -18 °C em freezer. A troca do fixador foi realizada após 10 minutos e 24 horas. As raízes selecionadas anteriormente, foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 5N por 18 minutos em temperatura ambiente. Lâminas com os meristemas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2%, sendo posteriormente cobertas por lamínula e vedadas com esmalte incolor. Foram avaliadas 1000 células meristemáticas por lâmina, totalizando 3000 células por tratamento para alface e cebola.

Os diferentes estágios da divisão mitótica foram observados em microscópio óptico e registrados, bem como as alterações cromossômicas e nucleares encontradas. Foram calculados o índice mitótico (IM), porcentagem de alterações nucleares (AN) (núcleo condensado e micronúcleo) e alterações cromossômicas (AC) (cromossomo perdido, aderência cromossômica, c-metáfase e ponte). Os parâmetros

de citotoxicidade foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$IM(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de células em divisão}}{n^{\circ} \text{ de células observadas}} \times 100$$

$$AN(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de células com alterações nucleares}}{n^{\circ} \text{ de células em divisão}} \times 100$$

$$AC(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de células com alterações cromossômicas}}{n^{\circ} \text{ de células observadas}} \times 100$$

A frequência de alterações nucleares e alterações cromossômicas foram obtidas individualmente pela equação a seguir:

$$\text{Frequência da alteração}(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de células com a alteração}}{n^{\circ} \text{ de células em divisão}} \times 100$$

2.9. Análise estatística

Os dados das análises macroscópicas e microscópicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores médios ao teste de Dunnett a $p \leq 0,05$. Esse teste foi escolhido, pois é capaz de realizar comparações múltiplas para vários tratamentos com um controle, além de ser sensível a pequenas diferenças entre grupos (Dunnett, 1955; McHugh, 2011). Toda a análise estatística foi realizada através do Programa R, versão 3.3.2 (R, 2020).

3. RESULTADOS

3.1. Rendimento e caracterização química do óleo essencial

O óleo essencial de *M. vittoriana* apresentou um rendimento médio de 0,098% (m/m) comparado à massa fresca da planta. As análises de cromatografia gasosa revelaram a presença de 17 compostos, porém apenas 10 foram identificados (Fig. 2 e 3), constituindo 82,36% de área relativa total dos compostos presentes no óleo. A composição do óleo foi predominantemente de sesquiterpenos, com 79,96% de sesquiterpenos hidrogenados e 02,40% de sesquiterpenos oxigenados (Tabela 1). Os principais compostos encontrados foram o germacreno D (21,90%), germacreno B (17,30%) e biciclogermacreno (11,90%) todos sesquiterpenos hidrogenados.

Tabela 1. Caracterização química e área relativa (%) dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de *Myrcia vittoriana*.

Pico	Tempo de Retenção	IR _{Cal} ^b	IR _{Tab} ^c	Nome	Área (%) ^d
1	26,479	1425	1425	δ-Elemeno	01,57
2	29,955	1463	1463	(E)-Cariofileno	07,50
3	30,042	1464	1464	α-Santaleno	08,82
4	30,688	1471	1471	α-Bergamoteno	05,37
5	31,655	1482	1482	Ni ^[c]	02,60
6	32,562	1492	1492	Germacreno D	21,90
7	33,168	1498	1498	Biciclogermacreno	11,90
8	33,449	1503	1503	Ni ^[e]	01,80
9	33,842	1513	1513	γ-Muuroleno	02,00
10	34,244	1524	1524	δ-Cadineno	03,60
11	35,544	1559	1559	Germacreno B	17,30
12	36,515	1583	1583	Ni ^[e]	02,40
13	36,819	1591	1591	Ni ^[e]	02,10
14	38,110	1626	1626	Ni ^[e]	01,60

15	38,732	1643	1643	Epi- α -Cadinol	02,40
16	39,216	1656	-	Nj ^[e]	03,67
17	39,776	1671	-	Nj ^[e]	03,59
Total identificado (%)					82,36
Classe dos compostos (%)					
Monoterpenos					-
Monoterpenos Oxigenados					-
Sesquiterpenos					79,96
Sesquiterpenos Oxigenados					02,40
Não identificados					17,76

^aCompostos listados por ordem de elucidação usando a coluna Rtx-5MS. ^bÍndice de retenção calculado a partir dos dados obtidos pela amostragem dos alcanos lineares (C7-C40). ^cÍndice de retenção tabulado (Adams, 2007). ^dÁrea relativa dos compostos presentes no óleo essencial. ^eCompostos não identificados.

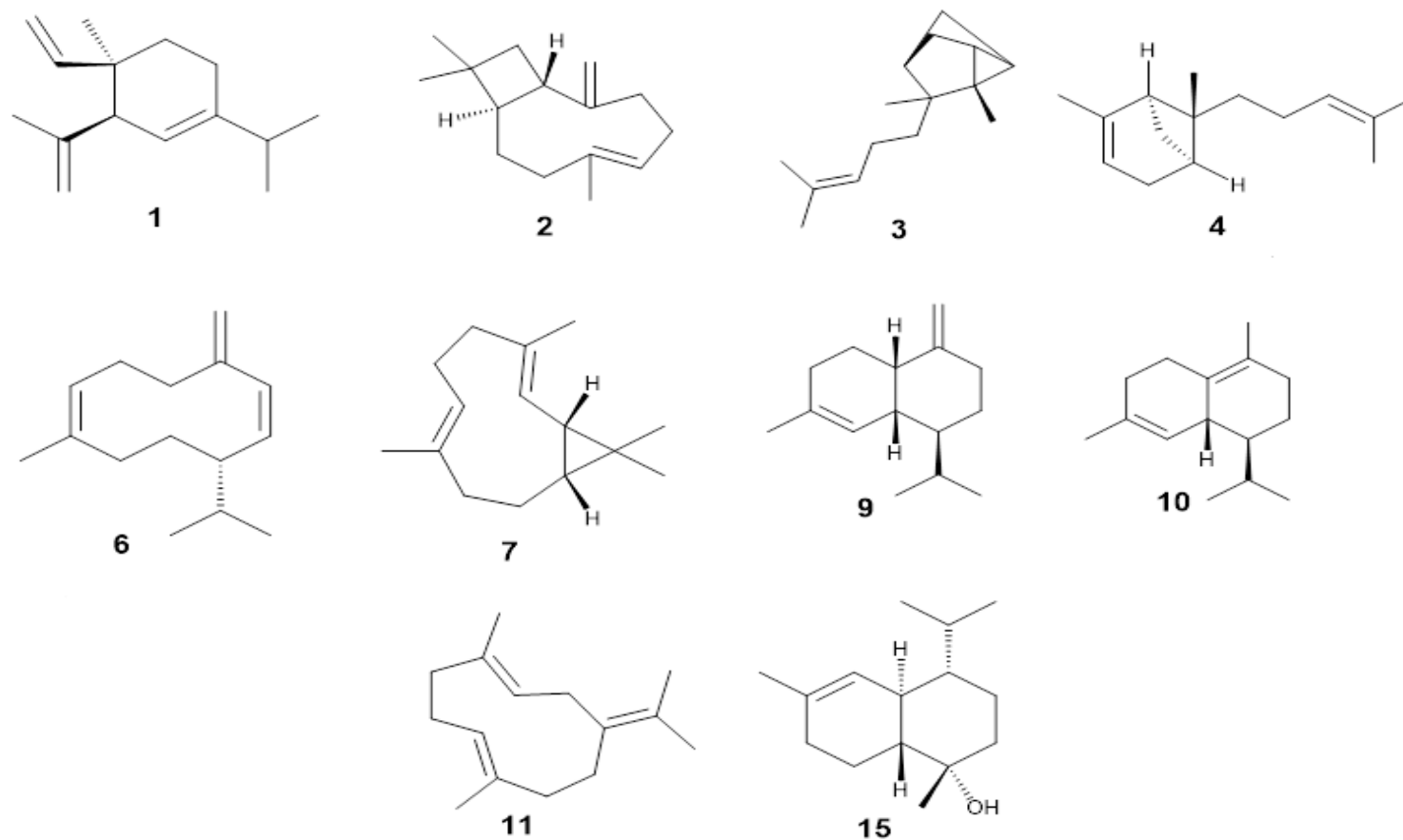


Figura 2. Estrutura molecular dos compostos identificados no óleo essencial de *Myrcia vittoriana*. 1) δ -Elemeno; 2) (E)-Cariofileno; 3) α -Santaleno; 4) α -Bergamoteno; 6) Germacreno D; 7) Biclogermacreno; 9) γ -Muuroleno; 10) δ -Cadineno; 11) Germacreno B; 15) Epi- α -Cadinol.

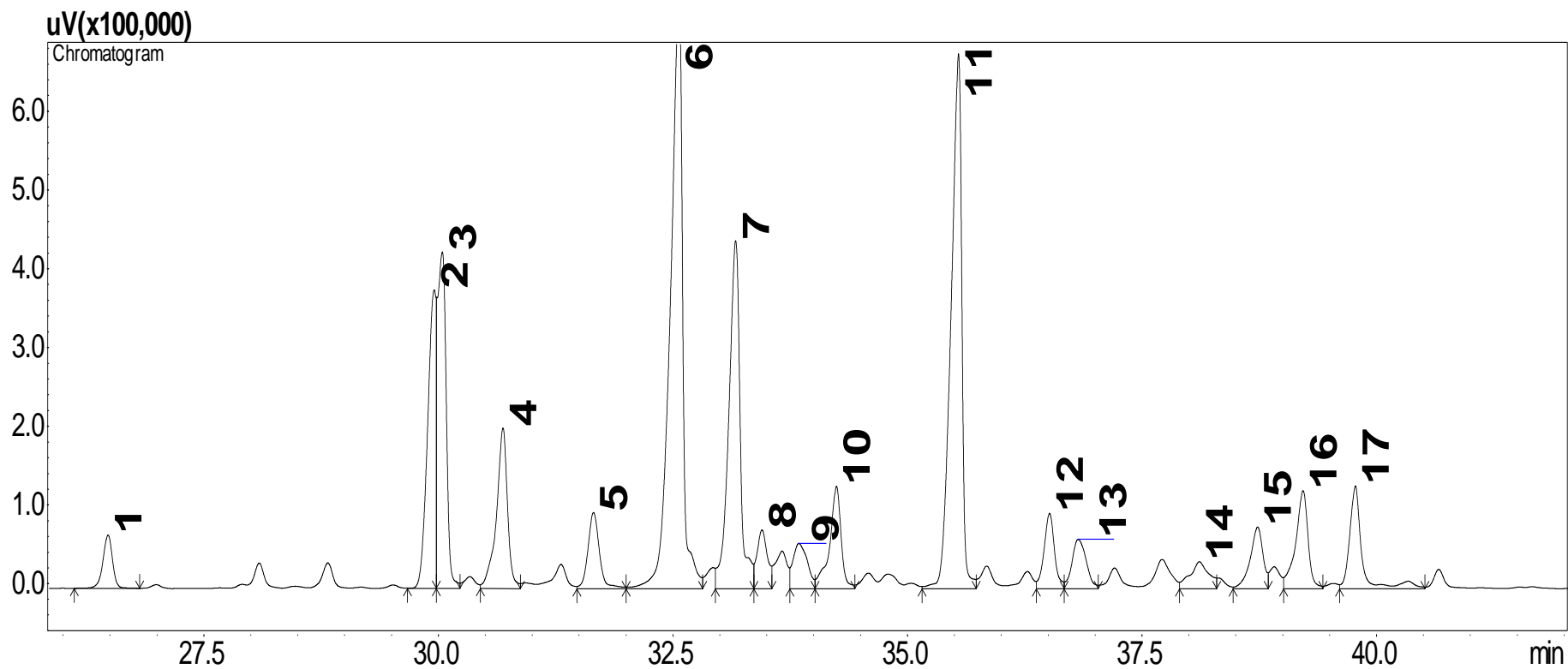


Figura 3. Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Myrcia vittoriana*. 1) δ -Elemeno; 2) (E)-Cariofileno; 3) α -Santaleno; 4) α -Bergamoteno; 6) Germacreno D; 7) Bicyclgermacreno; 9) γ -Muuroleno; 10) δ -Cadineno; 11) Germacreno B; 15) Epi- α -Cadinol.

3.2. Rastreo fitoquímico dos extratos

O rastreo fitoquímico foi realizado para 19 classes de compostos químicos (Tabela 2), desses apenas 4 não foram encontradas em nenhum dos extratos. O extrato aquoso apresentou com exclusividade resultado positivo para saponinas, por outro lado, o extrato etanólico foi o único que teve a presença de alcaloides, esteroides, antocianinas, antocianidinas, auronas, chalconas, xantonas e glicosídeos cardíacos confirmados. Das classes restantes, ácidos fixos fortes, catequinas, fenóis simples, flavonoides, taninos hidrolisáveis e terpenoides apresentaram resultado positivo para ambos os extratos.

Tabela 2. Classes de metabólitos secundários encontrados no extrato aquoso e extrato etanólico de *Myrcia vittoriana*.

Classe química	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Ácidos fixos fortes	+	+
Alcaloides	-	+
Catequinas	+	+
Esteroides	-	+
Fenóis simples	+	+
Antocianinas	-	+
Antocianidinas	-	+
Resinas	-	-
Auronas	-	+
Chalconas	-	+
Flavonoides	+	+
Leucoantocianidinas	-	-
Saponinas	+	-
Taninos condensados	-	-

Taninos hidrolisáveis	+	+
Xantonas	-	+
Glicosídeo cardíaco	-	+
Glicosídeo de antraquinona	-	-
Terpenoides	+	+

Os sinais (+) e (-) indicam, respectivamente, a presença ou ausência das classes químicas no material vegetal analisado.

3.3. Efeitos macroscópicos

O óleo essencial e os extratos aquoso e etanólico das folhas de *Myrcia vittoriana* afetaram significativamente ($p < 0,05$) as variáveis de germinação e crescimento das plantas modelo, *L. sativa* e *A. cepa*, utilizadas como receptoras (Tabela 3 e Tabela 4). O óleo essencial de *M. vittoriana* causou redução significativa na taxa de germinação, em relação à água (controle negativo), apenas para *A. cepa* nas concentrações de 187,5, 1500 e 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o decréscimo ocasionado pela maior concentração foi de 61,6% (Fig. 4a). Para *L. sativa*, as maiores concentrações testadas do extrato etanólico e extrato aquoso [100 (% v / v)] levaram a reduções de 19,2% e 84,8% na porcentagem de germinação, respectivamente, mostrando um efeito fitotóxico robusto. Os extratos não afetaram a porcentagem de germinação das sementes de *A. cepa* (Fig. 4b e c).

O índice de velocidade de germinação (IVG) para *A. cepa* foi reduzido em todas as concentrações de óleo essencial, exceto para 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com a redução mais evidente sendo para a maior concentração (Fig. 5a). O IVG das sementes de *L. sativa* foi afetado negativamente pelo extrato aquoso, com diferenças significativas de todos os controles para as concentrações 25, 50 e 100 (% v / v), com o IVG diminuindo de acordo com o aumento das concentrações (Fig. 5b). A concentração 100 (% v / v) do extrato etanólico também influenciou o IVG de *L. sativa*, com diferenças significativas de todos os controles. Esta concentração [100

(% v / v)] foi responsável pela redução mais significativa no IVG de sementes de *L. sativa* tratadas com o extrato aquoso e etanólico (Fig. 5c). Nenhum dos extratos testados influenciou o IVG de *A. cepa* (Fig. 5b e c).

O óleo essencial de *M. vittoriana* também afetou o crescimento das raízes das plantas modelo (Fig. 6). As concentrações de 750 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram o crescimento radicular de *A. cepa*, sendo que os efeitos inibitórios dessas concentrações não diferiram significativamente do controle positivo glifosato, um herbicida comercial. Por outro lado, as concentrações de 375 a 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causaram aumento no alongamento das raízes de *L. sativa*, com efeito estimulante comparável ao do controle negativo (Fig. 6a). Quase todas as concentrações de extrato aquoso de *M. vittoriana* suprimiram o alongamento da raiz de *L. sativa* e *A. cepa*, com as exceções sendo 6,25 e 12,5 (% v / v) para *A. cepa* (Fig. 6b). O estabelecimento de uma “resposta dose-dependente” foi observado para essas mudas, uma vez que a taxa de crescimento da raiz diminuiu com o aumento das concentrações. O extrato etanólico, na concentração mais alta (100% v / v), também afetou o crescimento das raízes de *L. sativa* (Fig. 6c).

O crescimento da parte aérea de *L. sativa* foi fortemente inibido pelo óleo essencial de *M. vittoriana*, com todas as concentrações diferindo significativamente da água (controle negativo) (Fig. 7a). As concentrações de 750 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não diferiram significativamente do glifosato (controle positivo). Uma relação dose-resposta também foi observada com concentrações crescentes de óleo essencial. A maior concentração (3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu 54,8% do crescimento aéreo das mudas em relação à água (controle negativo). Com essa concentração, observou-se nas mudas uma coloração amarelada, com escurecimento das raízes e presença de manchas escuras nas folhas (necrose) (fig. 8).

Tabela 3. Parâmetros macroscópicos avaliados em *Lactuca sativa* tratada com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de *Myrcia vitoriana*.

Tratamentos	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	G (%)	IVG	CR (mm)	CA (mm)
OE	187.5	*99.2 \pm 0.8abc	11.94 \pm 0.16 abc	9.27 \pm 1.43 ac	13.02 \pm 1.07
	375	94.4 \pm 2.71 abc	11.45 \pm 0.43 abc	13.94 \pm 0.28	11.48 \pm 0.65
	750	96.0 \pm 1.78 abc	11.64 \pm 0.24 abc	14.02 \pm 0.30	10.63 \pm 0.73b
	1500	96.0 \pm 1.78 abc	11.66 \pm 0.29 abc	13.83 \pm 0.33	8.53 \pm 1.18 b
	3000	95.2 \pm 1.95 abc	11.68 \pm 0.23 abc	12.66 \pm 0.46 a	8.21 \pm 0.62 b
EA	(% v/v)				
	6.25	96.0 \pm 1.78 abc	11.67 \pm 0.30abc	8.46 \pm 0.22c	19.21 \pm 0.46ac
	12.5	96.8 \pm 1.95 abc	11.66 \pm 0.23abc	7.17 \pm 0.15c	18.37 \pm 0.78ac
	25	92.8 \pm 0.8 abc	10.49 \pm 0.34	6.12 \pm 0.16	18.19 \pm 0.67ac
	50	93.6 \pm 4.11 abc	7.46 \pm 0.67	4.67 \pm 0.25b	18.00 \pm 1.21ac
100	12.0 \pm 3.34	0.57 \pm 0.14	2.56 \pm 0.29	15.1 \pm 0.88ac	
EE	6.25	96.0 \pm 1.26abc	11.65 \pm 0.21 abc	7.97 \pm 0.79c	18.77 \pm 0.53ac
	12.5	92.0 \pm 3.57 abc	11.02 \pm 0.68 abc	7.93 \pm 0.56c	17.95 \pm 0.51ac
	25	96.0 \pm 2.52 abc	11.49 \pm 0.45 abc	7.12 \pm 0.74c	19.04 \pm 0.40ac
	50	95.2 \pm 1.95 abc	11.75 \pm 0.20 abc	7.58 \pm 0.33c	19.21 \pm 0.39ac
	100	77.6 \pm 3.24	4.89 \pm 0.23	5.74 \pm 0.39b	15.90 \pm 0.84ac
Água	-	96.8 \pm 1.49 a	12.05 \pm 0.2 a	10.57 \pm 0.57a	18.17 \pm 1.06 a
Glifosato	-	96.0 \pm 1.26 b	11.89 \pm 0.12 b	4.32 \pm 0.11 b	8.31 \pm 0.45 b
MMS	-	99.2 \pm 0.8 c	12.07 \pm 0.29 c	8.00 \pm 0.55 c	17.77 \pm 0.93 c

*Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao glifosato; médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila), pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). \pm representa o erro padrão. As siglas representam: OE= óleo essencial, EA= extrato aquoso, EE= extrato etanólico, G%= porcentagem de germinação, IVG= índice de velocidade de germinação, CR= crescimento das raízes, CA= crescimento da parte aérea.

Tabela 4. Parâmetros macroscópicos avaliados em *Allium cepa* tratada com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de *Myrcia vitoriana*.

Tratamentos	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	G (%)	IVG	CR (mm)
OE	187.5	*44.8 \pm 11.82bc	2.30 \pm 0.57b	7.01 \pm 0.27ac
	375	56.00 \pm 9.12abc	2.78 \pm 0.46abc	6.85 \pm 0.39a
	750	53.6 \pm 11.77abc	2.61 \pm 0.59bc	5.59 \pm 0.57b
	1500	46.4 \pm 6.4bc	2.26 \pm 0.28b	5.74 \pm 0.30b
	3000	17.6 \pm 5.15b	0.83 \pm 0.25	5.33 \pm 0.23b
EA	(% v/v)			
	6.25	77.6 \pm 4.30ac	4.36 \pm 0.25ac	6.74 \pm 0.23a
	12.5	79.2 \pm 5.27ac	4.43 \pm 0.33ac	6.40 \pm 0.42a
	25	68.8 \pm 7.41ac	3.93 \pm 0.41ac	6.01 \pm 0.25b
	50	80.8 \pm 3.2ac	4.28 \pm 0.12ac	5.88 \pm 0.31b
EE	100	77.6 \pm 5.15ac	3.99 \pm 0.31ac	5.22 \pm 0.32b
	6.25	75.2 \pm 3.66ac	4.07 \pm 0.16ac	8.42 \pm 0.24ac
	12.5	72.8 \pm 4.8ac	3.81 \pm 0.26ac	8.38 \pm 0.30ac
	25	84.0 \pm 2.82ac	4.35 \pm 0.17ac	7.90 \pm 0.50ac
	50	79.2 \pm 5.85ac	4.00 \pm 0.28ac	7.99 \pm 0.22ac
100	78.4 \pm 2.99ac	3.77 \pm 0.10ac	6.68 \pm 0.39a	
Água	-	79.2 \pm 3.2a	4.40 \pm 0.23a	7.24 \pm 0.32a
Glifosato	-	46.4 \pm 4.30b	2.56 \pm 0.26b	5.19 \pm 0.30b
MMS	-	75.2 \pm 3.44c	4.17 \pm 0.21c	8.33 \pm 0.19c

*Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao glifosato; médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila), pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). \pm representa o erro padrão. As siglas representam: OE= óleo essencial, EA= extrato aquoso, EE= extrato etanólico, G%= porcentagem de germinação, IVG= índice de velocidade de germinação, CR= crescimento das raízes.

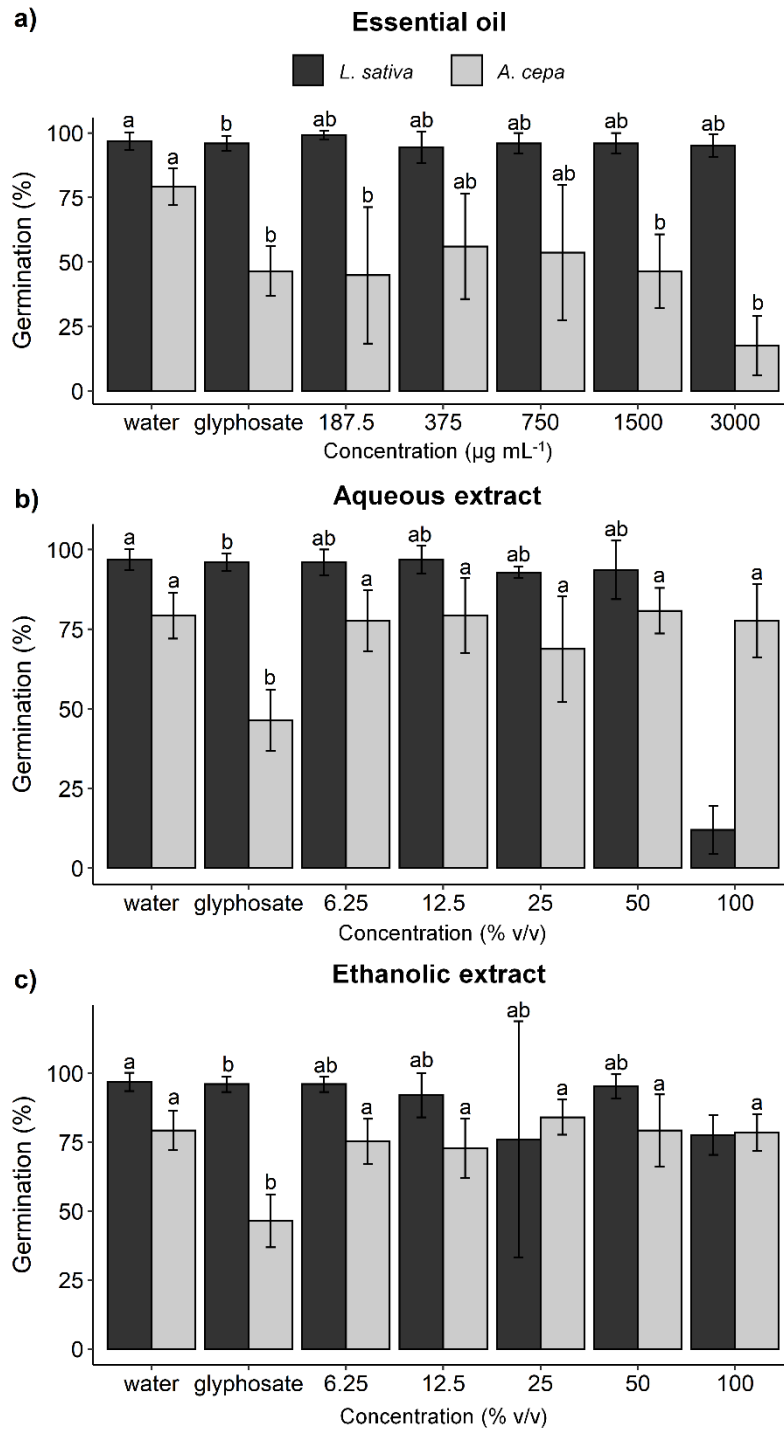


Figura 4. Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* na germinação de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média.

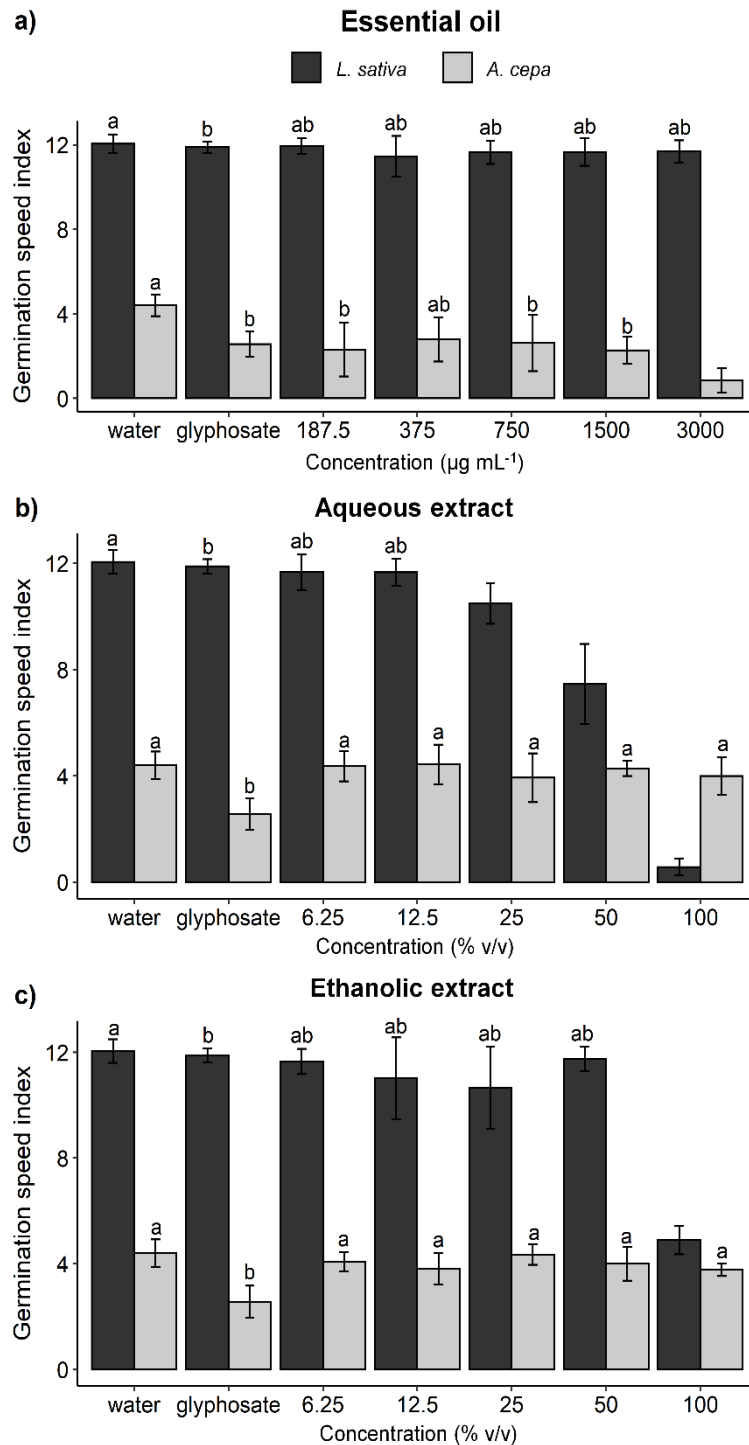


Figura 5. Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média.

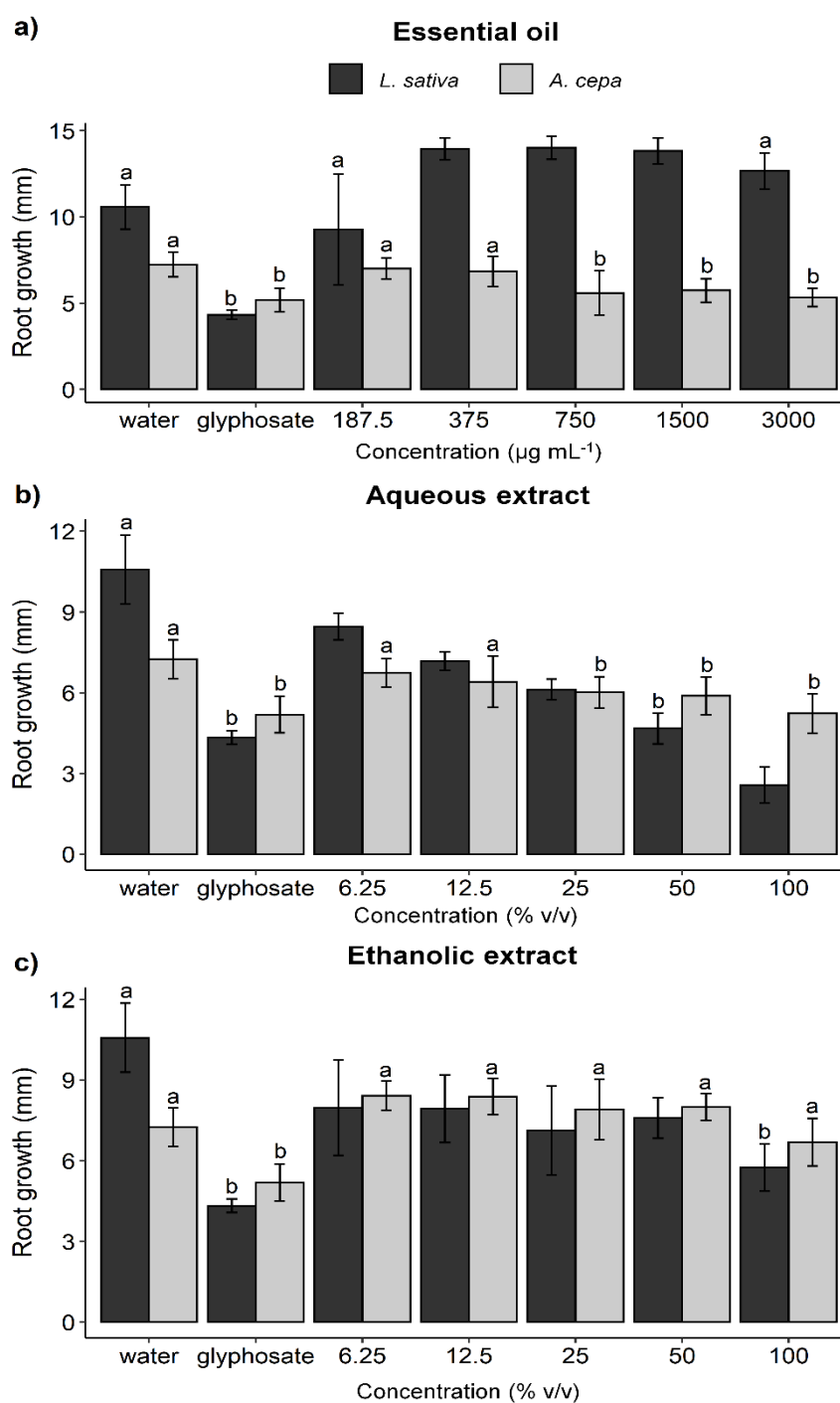


Figura 6. Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no crescimento radicular de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média.

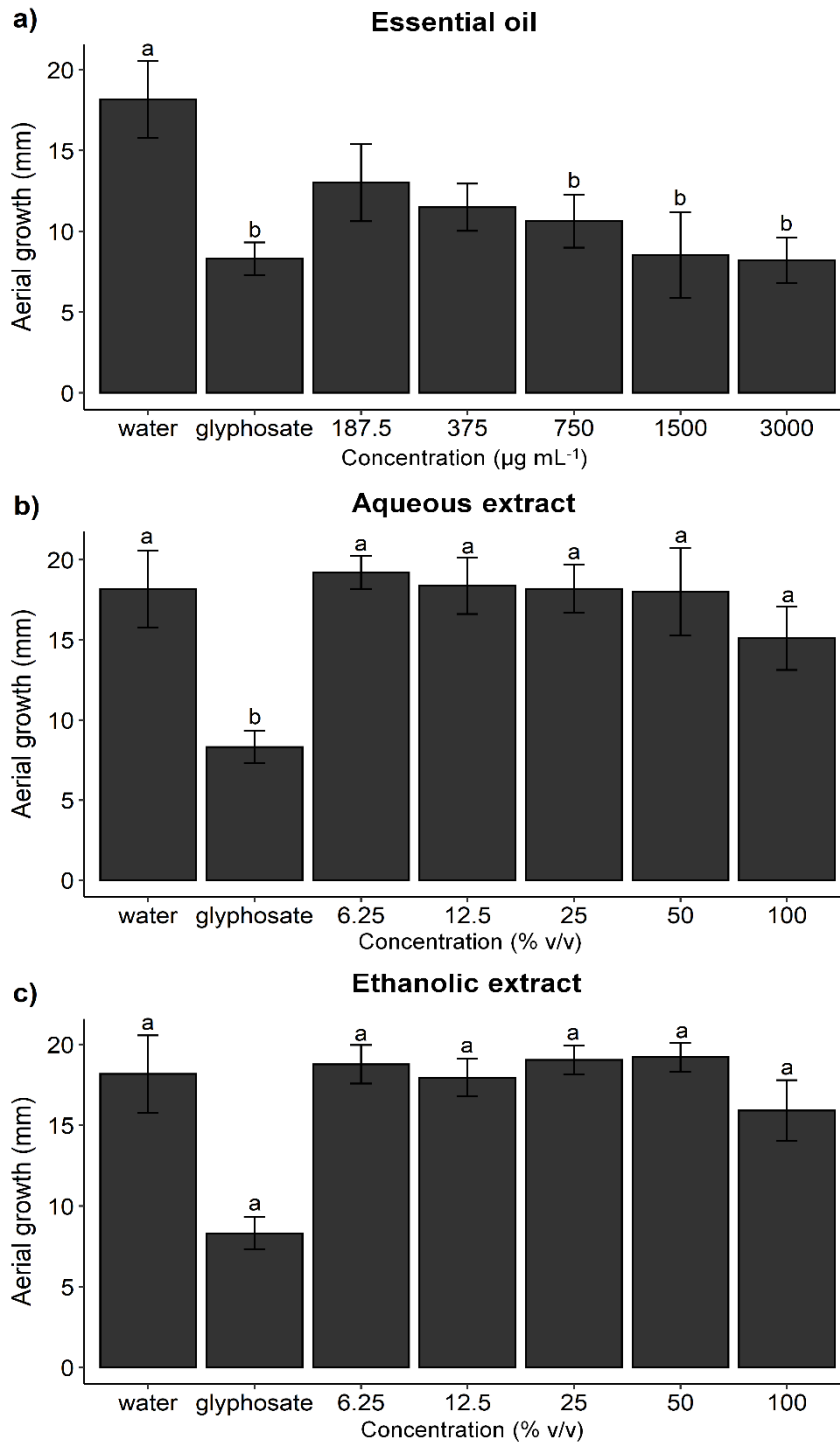


Figura 7. Efeito do óleo essencial (a), extrato aquoso (b) e extrato etanólico (c) de *Myrcia vittoriana* no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*. As médias nas colunas seguidas pela letra a não diferem significativamente da água; as médias seguidas pela letra b não diferem significativamente do glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Barras verticais com cada coluna representam o erro padrão da média.

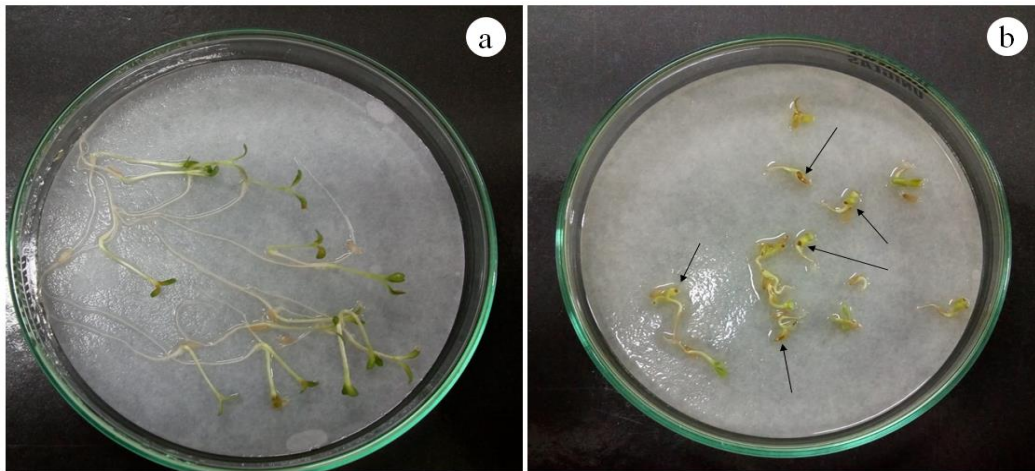


Figura 8. Efeito do óleo essencial de *Myrcia vittoriana* ($3000 \mu\text{g mL}^{-1}$) no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*. a: Plântulas tratadas com água destilada apresentando aspecto e coloração normais. b: Plântulas tratadas com a concentração $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial apresentando coloração amarelada, raízes escuras e manchas escuras na parte aérea.

3.4. Efeitos microscópicos

As tabelas 5 e 6 mostram os resultados das análises microscópicas nas células meristemáticas de raízes de *L. sativa* e *A. cepa* expostas ao óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico das folhas de *M. vittoriana*. Foi observado um efeito mitodepressivo apenas nas células de *A. cepa* tratadas com o extrato aquoso e etanólico. O extrato aquoso nas concentrações 6.25 e 12.5 (% v/v) causou uma redução do IM de 36,45% e 27.84%, enquanto que o extrato etanólico na concentração 100 (% v/v) causou uma redução de 27,5% em relação ao controle água. A exposição ao óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de *M. vittoriana* provocou vários tipos de alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), no entanto a porcentagem dessas alterações observadas em *A. cepa* não apresentaram diferença estatística para o controle água em nenhum dos tratamentos avaliados ($p < 0.05$) (Tabela 5). Para as plântulas de *L. sativa* tratadas com o extrato aquoso e extrato etanólico, a frequência de AC sofreu um aumento em relação ao controle negativo, sendo estatisticamente

igual ao controle positivo MMS em todas as concentrações, com exceção da concentração 6.25 (% v/v) do extrato aquoso (Tabela 6).

Em relação as anormalidades induzidas pelos tratamentos, foram observadas cromossomo perdido, aderência cromossômica, c-metáfase, ponte e interfase com micronúcleo (Fig. 10). As células de ponta de raiz de *L. sativa* tratadas com o extrato aquoso e com o óleo essencial de *M. vittoriana* apresentaram c-metáfases como alteração mais frequente, seguido de aderência cromossômica, cromossomo perdido e MNC (para o extrato aquoso). Para o extrato etanólico a distribuição das alterações encontradas foi similar a encontrada para o extrato aquoso, incluindo ponte cromossômica: c-metáfase > aderência> cromossomo perdido> ponte cromossômica> MNC (Fig. 9a). No modelo *A. cepa*, assim como em *L. ativa*, as anormalidades c-metáfase e aderência cromossômica foram as mais frequentes em todos os tratamentos. O extrato aquoso e etanólico apresentaram a distribuição de anormalidades parecida, sendo ela: c-metáfase> aderência cromossômica> ponte cromossômica> MNC. As células expostas ao óleo essencial apresentaram todas as anormalidades observadas, sendo a frequência de ocorrência: c-metáfase> aderência cromossômica> MNC> cromossomo perdido> ponte cromossômica (Fig. 9b).

Considerando a frequência dessas anormalidades foi observado um aumento significativo apenas nas células de *L. sativa* expostas ao extrato etanólico (Tabela 6). A porcentagem de aderência cromossômicas em *L. sativa* sofreu um acréscimo nas concentrações 12.5 e 50 (% v/v), não diferindo do controle MMS. A concentração 25 (% v/v) do extrato etanólico promoveu um aumento na frequência de c-metáfases, sendo igual estatisticamente ao herbicida glifosato e ao MMS. A frequência de pontes também sofreu influência positiva do extrato etanólico, apresentando um aumento na concentração 100 (% v/v), quando comparado aos controles positivos e negativo utilizados.

Outras anormalidades também apresentaram um acréscimo considerável em relação

aos controles, embora esse aumento não tenha sido significativo (em destaque nas Tabelas 5 e 6). Cromossomos perdidos foram induzidos nas células de *L. sativa* por todos os tratamentos avaliados, essa mesma anormalidade não foi observada em nenhum dos controles testados. Em *A. cepa* o óleo essencial de *M. vittoriana* também induziu essa anormalidade nas concentrações 350 e 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, essa alteração foi observada apenas no controle MMS.

Ponte cromossômica e micronúcleo não foram observados no controle negativo de nenhum dos modelos vegetais, no entanto, foram observados nos tratamentos avaliados. Em *A. cepa*, ponte cromossômica foi observada em todos os tratamentos testados, com destaque para o extrato aquoso onde ocorreu com maior frequência. Micronúcleos também foram identificados nas células de ponta de raiz expostas aos tratamentos, sendo o óleo essencial o que mais induziu essa anormalidade. Para o extrato aquoso apenas a concentração 100 (% v/v) induziu o aparecimento de micronúcleos. Em *L. sativa*, a concentração 100 (% v/v) do extrato etanólico induziu pontes cromossômicas nas células em anáfase, a mesma concentração no extrato aquoso também provocou o aparecimento de micronúcleos. Micronúcleos também foram observados nas células de *L. sativa* tratadas com as concentrações 12.5 e 100 (% v/v) do extrato etanólico.

Tabela 5. Análise de células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de *Myrcia vittoriana*.

Tratamentos	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IM%	AC%	AN%	Perdido%	Aderente%	C-met%	Ponte%	MNC%
OE	187.5	*9.53±0.81ac	0.2±0.05abc	0.23±0.14abc	0.00 ± 0.00abc	0.42±0.42abc	1.81±0.45ac	0.00 ± 0.00abc	0.23±0.14 abc
	375	10.2±0.64ac	0.36±0.08ac	0.13±0.08abc	0.74 ±0.74abc	1.62±0.63abc	1.35±0.43abc	0.00 ± 0.00abc	2.18±2.03 abc
	750	10.1±0.4ac	0.23±0.08abc	0.16±0.06abc	0.00 ± 0.00abc	0.68±0.68abc	1.33±0.36abc	0.34±0.34abc	0.16±0.06 abc
	1500	10.86±0.94ac	0.23±0.03abc	0.06±0.06abc	0.00 ± 0.00abc	0.64±0.33abc	1.59±0.40ac	0.00 ± 0.00abc	0.06±0.06 abc
	3000	9.8±0.58ac	0.4±0.11ac	0.06±0.03abc	0.38 ±0.38abc	2.12±0.72abc	1.02±0.06abc	0.38±0.38abc	0.06±0.03 abc
EA	6.25	7.6±0.55c	0.36±0.14abc	0.00±00abc	0.00±00abc	1.65±0.82 abc	2.54 ±0.58 abc	0.39±0.39abc	0.00±00 abc
	12.5	8.63±0.70c	0.5±0.20ac	0.00±00abc	0.00±00 abc	2.29±1.10 abc	2.67 ±1.47 abc	0.68±0.68 abc	0.00±00 abc
	25	11.16±0.91ac	0.4±0.1abc	0.00±00abc	0.00±00 abc	1.21±0.32 abc	1.86 ±0.58 abc	0.30±0.30 abc	0.00±00 abc
	50	10.56±0.58ac	0.36±0.06abc	0.00±00abc	0.00±00 abc	1.24±0.25 abc	1.84 ±0.44 abc	0.00±00 abc	0.00±00 abc
	100	9.66±0.46ac	0.16±0.08abc	0.16±0.12abc	0.00±00 abc	0.32±0.32 abc	0.68 ±0.68 abc	0.66±0.33 abc	0.16±0.12 abc
EE	6.25	10.13±0.66ac	0.43±0.06ac	0.03±0.03abc	0.00±00 abc	0.31±0.31 abc	3.36±0.78ac	0.68±0.34 abc	0.03±0.03 abc
	12.5	9.16±1.13ac	0.36±0.06ac	0.03±0.03abc	0.00±00 abc	1.89±0.50 abc	1.78±0.20abc	0.30±0.30 abc	0.03±0.03 abc
	25	9.2±0.52ac	0.23±0.06abc	0.03±0.03abc	0.00±00 abc	1.21±1.21 abc	1.39±0.94abc	0.00±00 abc	0.03±0.03 abc
	50	9.33±0.37ac	0.33±0.08ac	0.16±0.16 abc	0.00±00 abc	2.09±1.15 abc	1.43±0.36 abc	0.00±00 abc	0.16±0.16 abc
	100	8.66±0.56c	0.2±0.05 abc	0.16±0.12 abc	0.00±00 abc	1.12±1.12 abc	1.22±0.76 abc	0.00±00 abc	0.16±0.12 abc
Água	-	11.96±0.23a	0.2±00a	0.00±00a	0.00 ± 0.00a	0.28±0.28a	1.39±0.27a	0.00 ± 0.00a	0.00±00a
Glifosato	-	1.93±0.23b	0.00±00b	0.03±0.03b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.03±0.03b
MMS	-	9.66±0.49b	0.33±0.06c	0.3±0.15c	0.32±0.32c	2.52±1.07c	0.64±0.64c	0.00 ± 0.00c	0.3±0.15c

*Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente ao glifosato; médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila), pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). ± representa o erro padrão. As siglas representam: OE= óleo essencial, EA= extrato aquoso, EE= extrato etanólico, IM%= porcentagem índice mitótico, AC= porcentagem alterações cromossômicas, AN= porcentagem de alterações nucleares, Perdido%= frequência de cromossomo perdido, Aderente%= frequência de metáfase com aderência cromossômica, C-met%= frequência de c-metáfase, Ponte%= frequência de ponte cromossômica, MNC%= frequência de micronúcleo. Note que em negrito são encontrados valores consideravelmente maiores que o controle água embora não exista diferença significativa a $p < 0.05$.

Tabela 6. Análise de células meristemáticas de *Lactuca sativa* tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial, extrato aquoso e extrato etanólico de *Myrcia vittoriana*.

Tratamentos	(µg mL ⁻¹)	AC%			Aderente%			Ponte%	MNC%
		IM%	AN%	Perdido%	C-met%	Perdido%			
OE	187.5	*9.70 ± 0.83ac	1.56 ± 0.32c	0.10 ± 0.10ac	0.00 ± 0.00abc	1.82±1.05abc	6.25±2.33ac	0.00 ± 0.00abc	0.00 ± 0.00abc
	375	9.30 ± 0.78ac	0.80 ± 0.05abc	0.00 ± 0.00	0.41±0.41abc	2.85±1.30abc	5.40±0.55a	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00abc
	750	9.66 ± 0.56ac	1.00 ± 0.1bc	0.00 ± 0.00	0.97±0.53abc	3.69±1.34abc	5.32±1.27a	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00abc
	1500	10.5 ± 0.60ac	0.80 ± 0.11abc	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00abc	1.55±0.56abc	6.10±0.86ac	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00abc
	3000	10.4 ± 0.87ac	0.56 ± 0.14ab	0.00 ± 0.00	0.30±0.30abc	0.61±0.61abc	4.11±0.34a	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00abc
EA	6.25	11.06 ± 0.84ac	0.9 ± 0.17abc	0.03 ± 0.03ac	0.63±0.32	2.11±0.26 abc	4.98±0.89acd	0.00 ± 0.00abcd	0.00 ± 0.00 abc
	12.5	11.80 ± 0.65c	1.06 ± 0.23bc	0.20 ± 0.15ac	0.27±0.27abc	4.70±0.92 abc	3.89±0.55acd	0.00 ± 0.00 abcd	0.00 ± 0.00 abc
	25	10.50 ± 0.98ac	1.26 ± 0.20c	0.00 ± 0.00ac	0.00 ± 0.00abc	4.55±1.21 abc	6.71±3.09acd	0.00 ± 0.00 abcd	0.00 ± 0.00 abc
	50	11.46 ± 0.92ac	1.20 ± 0.1c	0.00 ± 0.00ac	0.00 ± 0.00abc	5.39±1.98 abc	4.92±0.61acd	0.00 ± 0.00 abcd	0.00 ± 0.00 abc
	100	10.56 ± 0.23ac	1.56 ± 0.20c	0.16 ± 0.12ac	0.00 ± 0.00abc	5.37±0.38 abc	8.54±1.98acd	0.00 ± 0.00 abcd	0.16 ± 0.12 abc
EE	6.25	11.23 ± 0.90d	1.23 ± 0.03d	0.20 ± 0.10ad	0.25±0.25 abc	3.82±0.98 abc	6.08±1.31ac	0.00 ± 0.00abc	0.00 ± 0.00 abc
	12.5	8.76 ± 0.31ad	1.33 ± 0.08d	0.03 ± 0.03ad	0.39±0.39 abc	10.34±1.97c	4.56±0.68a	0.00 ± 0.00 abc	0.03 ± 0.03 abc
	25	9.00 ± 0.20ad	1.60 ± 0.05d	0.03 ± 0.03ad	0.36±0.36 abc	6.00±1.77abc	10.32±1.15bc	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00 abc
	50	9.06 ± 0.46ad	1.40 ± 0.10d	0.00 ± 0.00a	0.34±0.34 abc	8.55±2.58c	6.52±2.01ac	0.00 ± 0.00 abc	0.00 ± 0.00 abc
	100	10.46 ± 0.74ad	1.40 ± 0.15d	0.10 ± 0.10ad	0.96±0.06 abc	4.72±0.80abc	6.04±1.06ac	1.59±0.33	0.10 ± 0.10 abc
Água	-	8.86 ± 0.20a	0.23 ± 0.03a	0.26 ± 0.12a	0.00 ± 0.00a	0.36±0.36a	2.25±0.05a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
Glifosato	-	2.63 ± 0.17b	0.43 ± 0.03b	4.20 ± 0.23b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	16.78±2.49b	0.00 ± 0.00b	0.03 ± 0.03b
MMS	-	9.53 ± 0.54c	1.56 ± 0.32c	0.26 ± 0.03 c	0.00 ± 0.00c	4.80±0.97c	11.08±1.30c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c

*Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente ao glifosato; médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila), pelo teste de Dunnett (p<0.05). ± representa o erro padrão. As siglas representam: OE= óleo essencial, EA= extrato aquoso, EE= extrato etanólico, IM%= porcentagem índice mitótico, AC= porcentagem alterações cromossômicas, AN= porcentagem de alterações nucleares, Perdido%= frequência de cromossomo perdido, Aderente%= frequência de metáfase com aderência cromossômica, C-met%= frequência de c-metáfase, Ponte%= frequência de ponte cromossômica, MNC%= frequência de micronúcleo. Note que em negrito são encontrados valores consideravelmente maiores que o controle água embora não exista diferença significativa a p<0.05.

Células com cromossomos aderentes foram observados com maior frequência por todos os tratamentos quando comparados a água, em ambos os modelos vegetais utilizados. Similar a anormalidade anterior, c-metáfases também foram observadas com maior frequência em relação a água em todos os tratamentos avaliados nas plantas modelos, com exceção das células expostas ao óleo essencial em *A. cepa*.

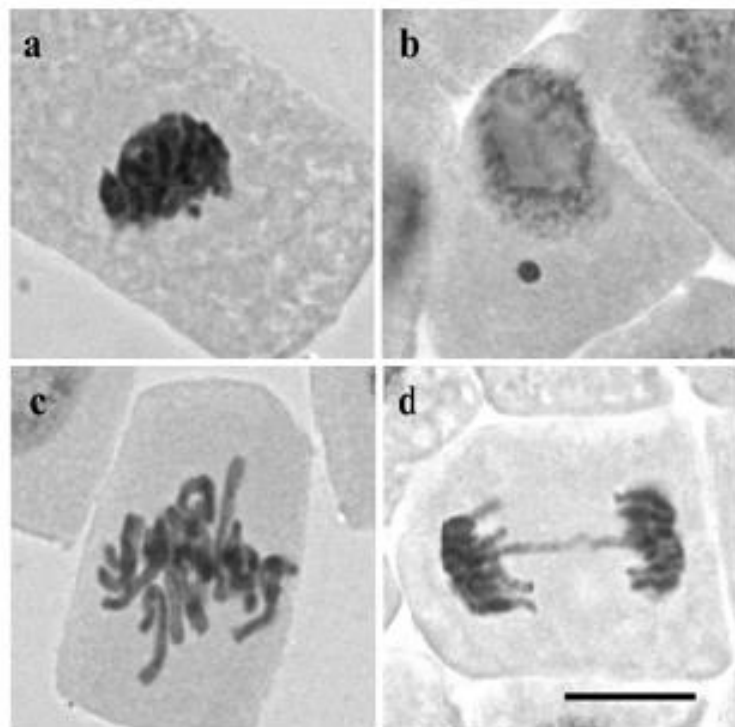


Figura 9. Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas ao óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *Myrcia vittoriana*. a) metáfase com aderência cromossômica, b) interfase com micronúcleo, c) c-metáfase, d) ponte cromossômica.

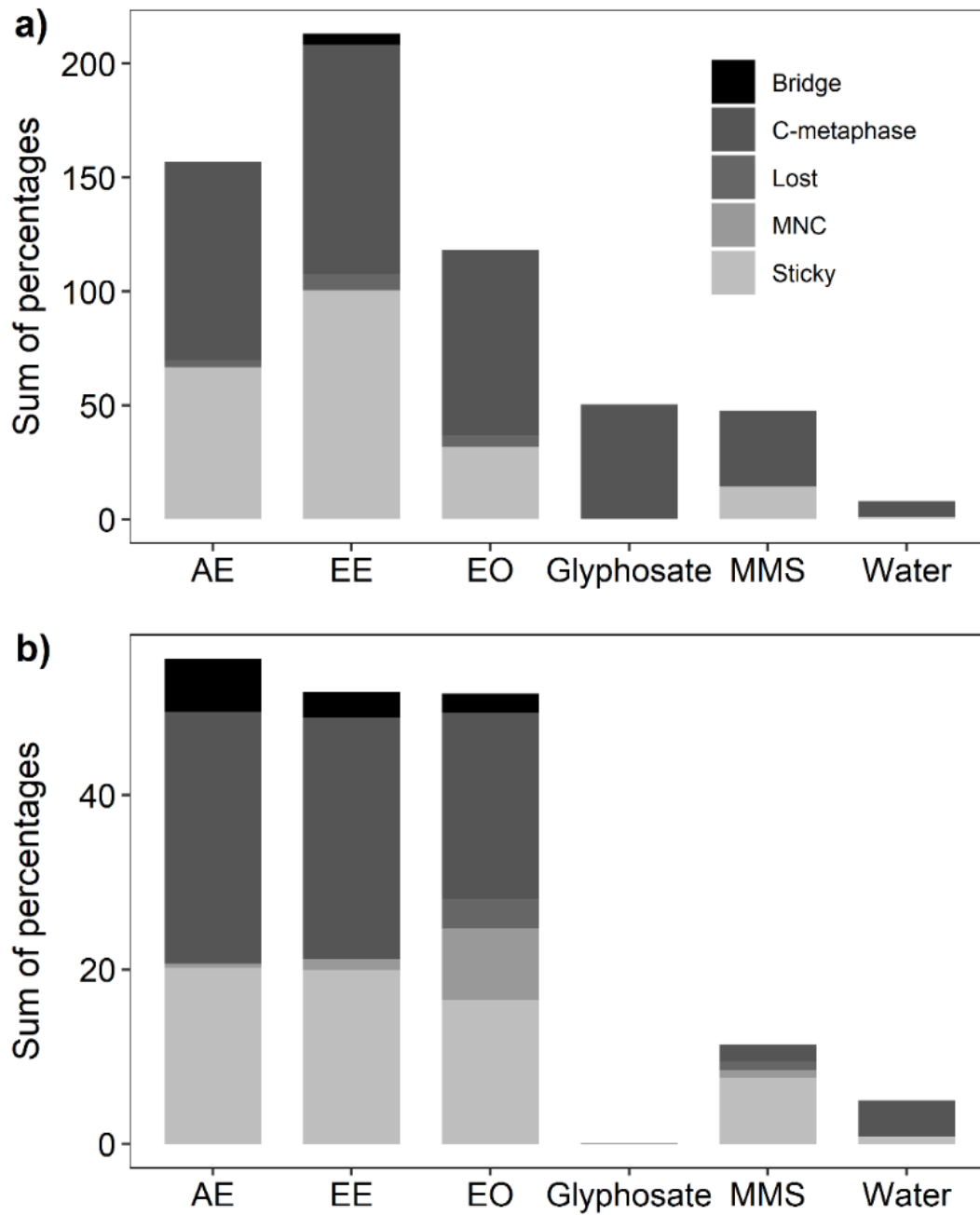


Figura 10. Distribuição das alterações cromossômicas e micronúcleo (MNC) observados no ciclo celular de células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* (a) e *Allium cepa* (b) expostas ao óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *Myrcia vittoriana*.

4. DISCUSSÃO

A atividade alelopática do óleo essencial, extrato aquoso e etanólico das folhas de *M. vittoriana* sobre as plantas modelos, *L. sativa* (eudicotiledônea) e *A. cepa* (monocotiledônea), foi demonstrada em condições de laboratório. Os resultados encontrados indicaram um efeito inibitório sobre a germinação e crescimento das plântulas nas espécies receptoras, principalmente nas concentrações mais altas. Esses resultados sugerem que os tratamentos obtidos a partir das folhas de *M. vittoriana* podem possuir fitotoxicidade e conter substâncias com atividade alelopática.

A análise do potencial fitotóxico de *M. vittoriana* através dos ensaios de germinação e crescimento realizados com as sementes das plantas modelos mostrou que a germinação das sementes de *A. cepa* foi sensível apenas ao óleo essencial de *M. vittoriana*, apresentando uma inibição de mais de 60% na porcentagem de germinação. O IVG dessas sementes também foi significativamente reduzido em relação ao controle negativo ($p < 0.05$) apresentando uma relação dose dependente com o aumento das concentrações. Por outro lado, *L. sativa* teve a germinação e o IVG fortemente afetados pela maior concentração dos extratos aquosos e etanólico de *M. vittoriana*, apresentando maior sensibilidade ao extrato aquoso, cuja maior concentração provocou mais de 80% de inibição da germinação e 95% de redução do IVG. O extrato aquoso de *M. vittoriana* influenciou o crescimento das radículas de *L. sativa* e *A. cepa* reduzindo-as de acordo com o aumento das concentrações. O mesmo aconteceu com as plântulas de *L. sativa* expostas ao extrato etanólico.

A germinação é o parâmetro considerado menos sensível na detecção de compostos com potencial alelopático, sendo a germinabilidade muitas vezes não afetada (Dias et al., 2017; Ferreira and Aquila, 2000). Segundo Blum (1999), a emergência da plântula e seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese

do indivíduo. Assim, a massa seca da raiz, o comprimento da radícula e parte aérea das plântulas, são os parâmetros mais utilizados no estudo de substâncias alelopáticas (Jacobi and Ferreira 1991; Aragão et al., 2015; Inderjit and Dakshini, 1995). De acordo com Freitas et al. (2016), a redução do comprimento da raiz indica a inibição da absorção de nutrientes, do alongamento celular, da divisão celular e morte celular. Nesta perspectiva, podemos observar que a fitotoxicidade do óleo essencial sobre *L. sativa* ocorreu apenas sobre o crescimento das plântulas.

O crescimento da parte aérea de *L. sativa* foi significativamente afetado por todas as concentrações do óleo essencial de maneira dose dependente, sendo a inibição da maioria das concentrações igual estatisticamente ao herbicida glifosato. A maior concentração do óleo provocou a despigmentação das folhas, o escurecimento das raízes e necrose na parte aérea das plântulas. Bhadoria (2011) constatou que o estresse alelopático induziu o aparecimento de plântulas anormais com sementes escuras e inchadas, folhas despigmentadas, ausência de pelos radiculares e necrose na ponta das raízes. Folhas com perda de pigmentação e com necrose em direção a ponta podem ocorrer devido a degradação de moléculas de pigmentos por danos oxidativos, afetando seriamente a fotossíntese (Hussain et al., 2017; Niu et al., 2013). Nesse sentido, o estresse oxidativo pode ter causado a supressão do crescimento da parte aérea pelo direcionamento e alocação dos poucos fotoassimilados para as raízes como uma estratégia adaptativa da plântula para sua sobrevivência através do aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes pela raiz. Isso explicaria a indução do crescimento das raízes em detrimento do crescimento aéreo das plântulas de *L. sativa* tratadas com o óleo essencial.

A inibição ou diminuição da germinação, assim como o atraso do IVG e a redução do crescimento das raízes e da parte aérea de plântulas são relatados como

efeitos alelopáticos provocados por inúmeras outras espécies de plantas (Aragão et al., 2015; Carvalho et al., 2019; Costa et al., 2019; Silva and Vieira, 2019; Vasconcelos et al., 2019). Em ambientes naturais, essas alterações dificultam o estabelecimento das plantas afetadas, modificando a dinâmica populacional das espécies e influenciando a sucessão de espécies dentro da comunidade (Peguero et al., 2012). As regras de montagem de uma comunidade também são alteradas pelas substâncias alelopáticas, visto que elas afetam as relações interespecíficas entre espécies expostas a essas substâncias (Viard-Crétat et al., 2012). Embora os efeitos sobre a germinação de sementes e crescimento de plântulas foram observados neste estudo em plantas modelos e em condições controladas, sugerimos que possivelmente as substâncias alelopáticas liberadas das folhas de *M. vittoriana* aliadas a melhores habilidades de produção de sementes exibidos por essa espécie (Garbin et al., 2016), permitem que *M. vittoriana* reduza a germinação e o estabelecimento de indivíduos selecionando as espécies que ocorrem sob sua copa em campo.

A composição química dos tratamentos fornece pistas sobre os efeitos fitotóxicos aqui encontrados. Esses efeitos podem ser relacionados à ação dos sesquiterpenos encontrados no óleo essencial e dos ácidos fixos fortes, terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos presentes nos extratos. Essas substâncias são reportadas pela capacidade de reduzir a germinação e o crescimento de diferentes espécies de plantas. Estes compostos podem ser liberados da parte aérea das plantas por lixiviação pela água da chuva ou pelo rompimento dos tecidos vegetais durante o processo de decomposição atingindo o solo (Rice, 1979; Putnam, 1987, Almeida, 1988). Substâncias químicas do grupo dos terpenos, como os sesquiterpenos, são liberados na forma volátil no ambiente (Pires and Oliveira, 2011).

O óleo essencial de *M. vittoriana* foi composto em totalidade por sesquiterpenos, apresentando os sesquiterpenos de hidrocarbonetos germacreno D (21,90%), germacreno B (17,30%) e biociclogermacreno (11,90%) como compostos majoritários. Esse perfil químico é semelhante a outros relatados em levantamentos para espécies do gênero *Myrcia*, na qual houve predominância de sesquiterpenos em relação à de monoterpenos (Scalvenzi et al., 2017; Stefanello et al., 2010). Scriveranti e Anton (2019) ao estudarem o potencial alelopático de espécies do gênero *Bothriochloa* (Poaceae), testaram o germacreno D e outros compostos isolados em diferentes plantas-teste e encontraram um forte efeito negativo na germinação e no crescimento. Considerado um precursor bioenergético de muitos sesquiterpenos (Bülow and König, 2000), o germacreno D é relatado por suas inúmeras atividades biológicas. Estudos associaram a presença do germacreno D a ação fitotóxica (El Ayeub-Zakhama et al., 2016; Seal et al., 2010; Duke, 1991), antifúngica (Lawson et al., 2020), inseticida (Birkett et al., 2008; Bruce et al., 2005; Kiran and Devi, 2007) e antibacteriana (Salazar et al., 2018) de óleos essenciais. A citotoxicidade do germacreno D também foi demonstrada por sua ação contra diferentes carcinomas humanos (Setzer et al., 2006). Portanto, é possível que este sesquiterpeno atue como um agente alelopático e seja responsável em grande parte pela atividade fitotóxica do óleo essencial de *M. vittoriana*. No entanto, é preciso considerar as interações entre os componentes majoritários e os componentes menores presentes no óleo essencial, visto que os efeitos alelopáticos muitas vezes estão relacionados à interação entre várias moléculas no lugar de um único composto (Araniti et al., 2013).

No rastreamento fitoquímico dos extratos aquoso e etanólico, confirmou-se a presença das classes de metabólitos ácidos fixos fortes, fénois simples, flavonoides, catequinas, taninos hidrolisáveis e terpenoides em ambos os extratos. Segundo (Taiz

et al., 2017) os fenóis, flavonoides e taninos são os metabolitos mais comumente associados com o efeito alelopático. Esses compostos fenólicos são reconhecidos por alterarem vários processos fisiológicos e bioquímicos, causando alterações na permeabilidade da membrana celular, fotossíntese, respiração celular e peroxidação lipídica, além de interferir na divisão celular e conseqüentemente no crescimento e desenvolvimento vegetal (Gog et al., 2005; John and Sarada, 2012; Li et al., 2010). O grupo dos flavonoides (que incluem as flavonas, flavononas, catequinas, antocianinas, entre outros) pode atuar no controle de hormônios e enzimas vegetais, na proteção contra herbivoria e como pigmentos (Shirley, 1996; Taiz et al., 2017). Além disso, essas substâncias são capazes de interferir na síntese de ATP mitocondrial e no transporte de elétrons nos cloroplastos (Moreland and Novitzky, 1987).

Nos últimos anos, 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). Os efeitos visíveis na germinação e crescimento são considerados manifestações secundárias da ação a nível celular ou molecular dos compostos tóxicos sobre as plantas receptoras, como alterações no ciclo celular e DNA (Ferreira and Aquila, 2000; Prates et al., 2000). Esse trabalho demonstrou a citotoxicidade do óleo essencial e extrato aquoso e etanólico de *M. vittoriana* através da diminuição do índice mitótico (IM) e detecção de anormalidades cromossômicas (AC) e nucleares (AN) no ciclo celular das plantas modelo *Lactuca sativa* L. e *Allium Cepa* L. Essas espécies são igualmente utilizadas como os modelos em estudos orientados a avaliar a citotoxicidade de substâncias. Além de serem altamente sensíveis a substâncias citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, essas espécies apresentam alta taxa de germinação e proliferação, e

seus cromossomos grandes favorecem as análises microscópicas no ciclo celular (Alves et al., 2018; Aragão et al., 2015; Fiskesjö, 1988; Silveira et al., 2017).

O índice mitótico (IM) é um parâmetro utilizado para indicar a citotoxicidade de substâncias (Leme and Marin-Morales, 2009). De acordo com Andrade et al. (2010) A redução do IM indica uma perturbação na divisão celular, o bloqueio do início da prófase e, conseqüentemente, o impedimento da divisão e proliferação celular (Sousa et al., 2009). O efeito mitodepressivo causado pelo extrato aquoso (concentrações 6.25 e 12.5%) e extrato etanólico (concentração 100%) nas células meristemáticas de *A. cepa* pode ter sido uma das causas da inibição do crescimento das raízes, visto que o alongamento radicular depende da divisão normal da célula. Soltys et al. (2011) explicaram a redução do crescimento radicular causada pelo aleloquímico cianamida, a partir da inibição do ciclo mitótico, da proliferação celular, bem como a presença de alterações arranjo do citoesqueleto em células de ponta de raiz de *A. cepa*. De acordo com esse estudo, células recém-formadas são o único meio de alongamento de órgãos através do aumento de células nas dimensões. Efeitos mitodepressivos também foram encontrados em estudos com os extratos de *Mimosa Pigra* L. (Koodkaew et al., 2018), *Amaranthus spinosum* L. e *Amaranthus viridis* L. (Carvalho et al., 2019), *Solanum muricatum* Ait. e *Solanum betaceum* Cav. (Santos et al., 2019).

O extrato aquoso e extrato etanólico de *M. vittoriana* também causaram a redução do crescimento radicular de *L. sativa*, embora não tenham provocado redução do IM nas observações citológicas. Esse fato pode ser explicado pela presença de saponinas e taninos nos extratos, substâncias hidrossolúveis que atuam na defesa contra herbívoros e patógenos amplamente conhecidas por seu potencial alelopático (Ferreira and Aquila, 2000; Rice, 1984).

As saponinas foram encontradas somente no extrato aquoso de *M. vittoriana*.

Segundo Marchaim et al. (1974) esse metabólito é capaz de afetar a germinação e crescimento inicial de plântulas através da redução da taxa de respiração das sementes dificultando a difusão de oxigênio através do tegumento. A presença das saponinas pode ter contribuído para a maior sensibilidade das sementes de *L. sativa* e *A. cepa* ao extrato aquoso, quando comparado com o extrato etanólico. Os taninos hidrolisáveis foram encontrados tanto no extrato aquoso como no extrato etanólico. Os taninos são capazes de se ligar a proteínas de forma irreversível, formando precipitados que não podem ser metabolizados pelas enzimas digestivas (Taiz et al., 2017; Zucker, 1983). Castro e Ferreira (2001) relataram a capacidade dos taninos hidrolisáveis em atuarem como inibidores da germinação e crescimento de plantas, assim como de bactérias nitrificantes e fixadoras de nitrogênio. Nesta perspectiva, a redução do crescimento das raízes expostas aos extratos aquoso e etanólico de *M. vittoriana* pode ter ocorrido como uma consequência da ação das saponinas e taninos sobre a germinação de *L. sativa*, evidenciada pela redução da porcentagem de germinação e diminuição do IVG. Luber et al. (2015) ao estudarem o potencial alelopático da infusão de *Psidium guajava* L. observaram a redução do crescimento das raízes sem que houvesse diminuição do IM de *L. sativa*, associando esse efeito a presença de taninos em infusões de cultivares da goiabeira. De acordo com os autores, as raízes começaram a crescer após a germinação, sem que a proliferação celular fosse afetada pelas infusões. O mesmo pode ter ocorrido com as plântulas de *A. cepa* expostas ao óleo essencial de *M. vittoriana*. O óleo pode ter causado a redução dos parâmetros germinativos e do crescimento radicular sem que houvesse um efeito mitodepressivo nas células meristemáticas de *A. cepa*. De fato, o sinergismo entre os compostos do óleo essencial pode ter causado esse fenômeno. Sharifi-Rad et al. (2017) afirmou que um dos mecanismos principais relacionados ao efeito

citotóxico dos óleos essenciais é a indução da morte celular, que pode ocorrer pela ativação da via de apoptose e ou necrose. Os compostos de baixo peso molecular e de natureza lipofílica presente nos óleos essenciais atravessam as membranas celulares alterando sua composição e permeabilidade, permitindo o extravasamento de íons e moléculas citoplasmáticas. Como resultado a produção de ATP é reduzida, o gradiente de pH é alterado, o potencial mitocondrial pode ser perdido, comprometendo a sobrevivência da célula.

Os danos não reparados no DNA também levam a ativação dos mecanismos de morte celular (Carvalho et al., 2019). O aumento da frequência de alterações cromossômicas em relação ao controle água indica a ação genotóxica das substâncias presentes no óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *M. vittoriana*. Essas alterações ocorrem a partir de modificações na estrutura e/ou número de cromossomos (Leme and Marin-Morales, 2009). O tipo de modificação induzida pelo composto tóxico indica seu modo de ação sobre o material genético. Compostos clastogênicos induzem quebras no DNA enquanto compostos aneugênicos interferem no fuso mitótico, levando a erros durante a segregação cromossômica, resultando na eliminação de material genético e na formação de células poliploides (Fernandes et al., 2007).

Os resultados das análises microscópicas indicam que tanto o óleo essencial, quanto o extrato aquoso e etanólico apresentam modos de ação, aneugênico e clastogênico. No entanto, assim como nos ensaios de germinação e crescimento, foram observadas diferenças na sensibilidade das espécies modelos aos tratamentos. O tamanho da semente, permeabilidade do tegumento, diferentes mecanismos de absorção em *L. sativa* e *A. cepa* podem ter influenciado a ação alelopática dos tratamentos (Pellissier, 2013).

Neste estudo foi possível observar a maior incidência de células com aderência cromossômica e c-metáfases em ambos os tratamentos, tanto para *L. sativa* quanto para *A. cepa*. Essas anormalidades são causadas por agentes aneugênicos. A aderência é caracterizada pela formação de aglomerados devido a ligação de substâncias tóxicas aos grupos fosfato do DNA durante a condensação ou pela formação de ligações inter e intracromatídeas (Babich, 1997; El-Ghamery et al., 2003). De acordo com El-Ghamery et al. (2003) essa anormalidade pode posteriormente ser relacionada ao surgimento de quebras cromossômicas e formação de pontes entre as cromátides. Isso corrobora com os resultados encontrados neste estudo.

Em *A. cepa* todos os tratamentos induziram a formação de pontes cromossômicas em anáfase. O extrato etanólico também induziu pontes cromossômicas em *L. sativa*. A formação das pontes é uma alteração clastogênica que ocorre pela perda dos telômeros por quebras nas extremidades cromossômicas seguida pela união das cromátides (Leme and Marin-Morales, 2009; Matsumoto et al., 2006). Os telômeros são responsáveis por proteger e estabilizar os cromossomos, e sua ausência resulta na ligação de um cromossomo a outro, formando um cromossomo dicêntrico durante a segregação para os pólos da célula durante a anáfase e telófase (El-Ghamery et al., 2003; Leme and Marin-Morales, 2009).

Catequinas foram identificadas no extrato aquoso etanólico de *M. vittoriana*. Esses compostos foram reportados pela capacidade de alterar a conformação de moléculas como DNA polimerases e topoisomerases em mamíferos, comprometendo suas funções celulares e assim a fisiologia celular (Mizushina et al., 2005; TrnKová et al., 2013; Yoshida et al., 2013). Farhan et al. (2015) associaram a quebra oxidativa do DNA em linfócitos humanos a ação das catequinas. A ação clastogênica dos extratos aquoso e etanólico pode ser associada à presença dessas substâncias, visto que as

células meristemáticas de *A. cepa* e *L. sativa* apresentaram anormalidades cromossômicas decorrentes de quebras no DNA, como as pontes cromossômicas.

As c-metáfases e os cromossomos perdidos são alterações aneugênicas relacionadas à ação de agentes sobre as fibras do fuso mitótico durante a metáfase. As c-metáfases ocorrem na ausência do fuso mitótico, resultando em cromossomos espalhados e condensados com centrômeros muito bem definidos no interior da célula, distinguindo-se da metáfase normal em que os cromossomos ficam alinhados no plano de divisão celular (Fernandes et al., 2007; Leme and Marin-Morales, 2009). Os cromossomos perdidos resultam da não orientação pelas fibras do fuso durante a metáfase. O cromossomo não é reconhecido pelo fuso mitótico devido a efeitos epigenéticos na fosforilação da serina 10 da histona H3 na região pericentomérica (Freitas et al., 2016). Assim, a indução de c-metáfases e cromossomos perdidos nas plantas modelos pode ter ocorrido pela ação de substâncias aneugênicas presentes no óleo essencial e nos extratos das folhas de *M. vittoriana* sobre as proteínas que formam ou regulam o fuso mitótico.

Micronúcleos foram induzidos pela maioria dos tratamentos, com exceção do óleo essencial nas células meristemáticas de *L. sativa*. Essa anormalidade indica o efeito mutagênico de uma substância. Ela é originada a partir de fragmentos e perdas cromossômicas não incorporadas no núcleo durante o ciclo celular (Fenech, 2000). Neste estudo ela pode ter surgido a partir dos cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase como foi observado na maioria dos tratamentos (Fernandes et al., 2007).

Como reportado neste trabalho, a composição química do óleo essencial apresentou predominância em sesquiterpenos, com destaque para o germacreno D, enquanto nos extratos aquoso e etanólico a presença de compostos fenólicos, taninos, catequinas, e saponinas foram identificadas. Esses compostos podem ter

contribuído para atividade fitotóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica dos tratamentos. As saponinas, os taninos, os flavonoides, alguns compostos fenólicos e as catequinas são substâncias hidrossolúveis e que podem ser liberadas em condições naturais seja pela lixiviação pela água da chuva ou pela decomposição de resíduos vegetais (Rice, 1984; Ferreira and Aquila 2000). Os sesquiterpenos também podem ser liberados naturalmente no ambiente por volatilização, como visto anteriormente. Essas substâncias ao se infiltrarem no solo podem entrar em contato com as sementes e plântulas de suas vizinhas inibindo a germinação e estabelecimento dessas espécies. Os compostos voláteis, como os sesquiterpenos, são responsáveis pela diferença na composição florística no local de desenvolvimento de plantas com atividade alelopática que os possuem (Pires and Oliveira, 2011). Neste sentido, podemos sugerir que o efeito alelopático de *M. vittoriana* em campo possa ocorrer pela volatilização de seus sesquiterpenos ou pela lixiviação das substâncias hidrossolúveis presentes em suas folhas para o solo, seja pela chuva ou pela serapilheira formada com a queda de suas folhas.

De acordo com Ferreira e Áquila (2000) os aleloquímicos podem atuar de forma direta e indireta. A ação indireta consiste na alteração das propriedades do solo, como status nutricional e a atividade de micro-organismos. Já a atuação direta ocorre quando o aleloquímico se liga às membranas da planta receptora ou penetra na célula, interferindo assim no metabolismo da planta.

Como o óleo essencial, o extrato aquoso e etanólico de *M. vittoriana* apresentaram diferentes substâncias químicas, sugerindo que talvez mais de um composto seja responsável pelos efeitos encontrados. De acordo com Chotsaeng et al. (2017) as interações sinérgicas entre os compostos podem resultar em combinações complexas com grande diversidade estrutural. Assim, o sinergismo entre

os compostos contribui para a complexidade das interações das plantas em ambientes naturais, como a alelopatia, visto que ela é um fenômeno que ocorre devido à interação entre diferentes moléculas liberadas no ambiente.

5. CONCLUSÃO

Myrcia vittoriana apresentou efeito alelopático em *L. sativa* e *A. cepa*. Os compostos com potencial alelopático identificados no óleo e nos extratos aquoso e etanólico de *M. vittoriana* podem ser liberados em condições naturais. Os sesquiterpenos são compostos voláteis e os compostos fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas e catequinas são hidrossolúveis, de forma que no ambiente esses compostos podem ser liberados por volatilização ou serem lixiviados pela chuva ou por resíduos em decomposição, atingindo outras espécies de plantas e o solo. Desta forma, é possível que *M. vittoriana* exerça efeito alelopático sobre outras espécies plantas, tanto em monocotiledôneas quanto em eudicotiledôneas, em seu ambiente natural de ocorrência. Neste cenário, a espécie pode estar exercendo um papel relevante na definição dos padrões de distribuição espacial em comunidades vegetais. Estudos futuros devem focar em testar o efeito alelopático desta espécie em experimentos conduzidos à campo sobre as espécies possivelmente afetadas, visando o isolamento e a identificação das substâncias tóxicas presentes nas folhas de *M. vittoriana*, assim como a elucidação da maneira com que esses compostos são liberados no meio ambiente.

6. REFERÊNCIAS

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed. 4), Allured Publishing Corporation.
- Alves, T.A., Pinheiro, P.F., Fontes, M.M.P., Andrade-Vieira, L.F., Corrêa, K.B., Alves, T. A., Cruz, F.A. da, Júnior, V.L., Ferreira, A., Soares, T.C.B., 2018. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Ind. Crops Prod.* 114, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.071>
- Andrade, L.F., Davide, L.C., Gedraite, L.S., 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.012>
- Aragão, F.B., Palmieri, M.J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V.T., Pinheiro, P.F., Andrade-Vieira, L.F., 2015. Phytotoxic and cytotoxic effects of eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopath. J.* 35, 259–272.
- Araniti, F., Graña, E., Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A.M., Abenavoli, M.R., 2013. Individual and joint activity of terpenoids, isolated from *Calamintha nepeta* extract, on *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.827193>
- Ayoola, G., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., Obaweya, K., Ezennia, E., Atangbayila, T., 2008. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm. Res.* <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14686>
- Babich, H., 1997. The “Allium” Test: A Simple, Eukaryote Genotoxicity Assay. *Am. Biol.*

Teach. <https://doi.org/10.2307/4450386>

Bessa, N.G.F., Borges, J.C.M., Beserra, F.P., Carvalho, R.H.A., Pereira, M.A.B., Fagundes, R., Campos, S.L., Ribeiro, L.U., Quirino, M.S., Chagas Junior, A.F., Alves, A., 2014. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. *Rev. Bras. Plantas Med.* <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>

Birkett, M.A., Abassi, S. Al, Kröber, T., Chamberlain, K., Hooper, A.M., Guerin, P.M., Pettersson, J., Pickett, J.A., Slade, R., Wadhams, L.J., 2008. Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggar, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.017>

Blanco, J.A., 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecol. Modell.* <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2007.06.014>

Bruce, T.J.A., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A.M., Martin, J.L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L.E., Wadhams, L.J., 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag. Sci.* <https://doi.org/10.1002/ps.1102>

Blum, U., 1999. Designing laboratory plant debris-soil bioassays: some reflections. *Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions*, 17-24.

Bülow, N., König, W.A., 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: Investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00266-1)

Callaway, R.M., Ridenour, W.M., 2004. Novel weapons: Invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front. Ecol. Environ.*

[https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0436:NWISAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0436:NWISAT]2.0.CO;2)

Carvalho, M.S.S., Andrade-Vieira, L.F., Santos, F.E. dos, Correa, F.F., das Graças Cardoso, M., Vilela, L.R., 2019. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. Sci. Hortic. (Amsterdam). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.001>

Castro, H., FERREIRA, F., 2001. Contribuição ao estudo das plantas medicinais (*Baccharis genistelloides*). Viçosa: Ed. UFV.

Chotsaeng, N., Laosinwattana, C., Charoenying, P., 2017. Herbicidal activities of some allelochemicals and their synergistic behaviors toward *Amaranthus tricolor* L. Molecules. <https://doi.org/10.3390/molecules22111841>

Chou, C.H., 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. [https://doi.org/10.1016/S0735-2689\(99\)00393-7](https://doi.org/10.1016/S0735-2689(99)00393-7)

Costa, R.O., José, C.M., Grombone-Guaratini, M.T., & Matos, D.M.S., 2019. Chemical characterization and phytotoxicity of the essential oil from the invasive *Hedychium coronarium* on seeds of Brazilian riparian trees. *Flora*, 257, 151411.

Dias, M.P., Nozari, R.M., Santarém, E.R., 2017. Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. *Allelopath. J.* <https://doi.org/10.26651/2017-42-1-1103>

Duke, S.O., 1991. Plant terpenoids as pesticides. In: Keeler, F., Tu, A.T. (Eds.), *Toxicology of Plant and Fungal Compounds: Handbook of Natural Toxins*, vol. 6. Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Dunnett, C.W., 1955. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Am. Stat. Assoc.*

<https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>

El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A., Abou El-Yousser, M.A., 2003. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00052-4)

El Ayeb-Zakhama, A., Sakka-Rouis, L., Bergaoui, A., Flamini, G., Jannet, H. Ben, Harzallah-Skhiri, F., 2016. Chemical Composition and Allelopathic Potential of Essential Oils from *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze Cultivated in Tunisia. *Chem. Biodivers.* <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500083>

Farhan, M., Zafar, A., Chibber, S., Khan, H.Y., Arif, H., Hadi, S.M., 2015. Mobilization of copper ions in human peripheral lymphocytes by catechins leading to oxidative DNA breakage: A structure activity study. *Arch. Biochem. Biophys.* <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.06.019>

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>

Fernandez, C., Santonja, M., Gros, R., Monnier, Y., Chomel, M., Baldy, V., Bousquet-Mélou, A., 2013. Allelochemicals of *Pinus halepensis* as Drivers of Biodiversity in Mediterranean Open Mosaic Habitats During the Colonization Stage of Secondary Succession. *J. Chem. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0239-6>

Fiskesjö, G., 1988. The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*

[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90096-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90096-6)

Franco, D.M., Saldanha, L.L., Silva, E.M., Nogueira, F., Dokkedal, A.L., Santos, C., Rolim De Almeida, L.F., 2015. Effects of leaf extracts of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. on growth and gene expression during root development of *Sorghum bicolor* (L.) moench. *Allelopath. J.*

Freitas, A.S., Fontes Cunha, I.M., Andrade-Vieira, L.F., Techio, V.H., 2016. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>

Garbin, M.L., Guidoni-Martins, K.G., Hollunder, R.K., Mariotte, P., Scarano, F.R., Carrijo, T.T., 2016. Spatial segregation of subordinate species is not controlled by the dominant species in a tropical coastal plant community. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2015.12.002>

Gog, L., Berenbaum, M.R., DeLucia, E.H., Zangerl, A.R., 2005. Autotoxic effects of essential oils on photosynthesis in parsley, parsnip, and rough lemon. *Chemoecology.* <https://doi.org/10.1007/s00049-005-0294-8>

Ferreira, A.G., Aquila, E.M.E.A., 2000. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia, in: *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.*

Hussain, M.I., Borah, P., Hussain, I., Kumar Sharma, R., Chandra Kalita, M., 2017. Necrotic Enteritis by Beta2toxin-Producing *Clostridium perfringens* in Doom Pigs of Assam, India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.206>

Imatomi, M., Novaes, P., Gualtieri, S.C.J., 2013a. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. *Acta Bot. Brasilica.* <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000100008>

- Imatomi, M., Novaes, P., Matos, A.P., Gualtieri, S.C.J., Molinillo, J.M.G., Lacret, R., Varela, R.M., Macías, F.A., 2013b. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochem. Syst. Ecol.* <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.09.005>
- Imatomi, M., Novaes, P., Miranda, M.A.F.M., Gualtieri, S.C.J., 2015. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. *Acta Sci. Agron.* <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19079>
- Inderjit, Dakshini, K.M.M., 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *Bot. Rev.* <https://doi.org/10.1007/BF02897150>
- Inderjit, Duke, S.O., 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217, 529–539.
- Inderjit, 2005. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0159-x>
- Inderjit, Wardle, D.A., Karban, R., Callaway, R.M., 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.08.003>
- Jacobi, U.S., & Ferreira, A.G., 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26(7), 935-943.
- John, J., Sarada, S., 2012. Role of phenolics in allelopathic interactions. *Allelopath. J.*
- Joshi, A., Bhoje, M., Sattarkar, A., 2013. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcosm* Linn. *J. Chem. Pharm. Res.*
- Kato-Noguchi, H., Kimura, F., Ohno, O., Suenaga, K., 2017. Involvement of allelopathy in inhibition of understory growth in red pine forests. *J. Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.006>
- Koodkaew, I., Senaphan, C., Sengseang, N., Suwanwong, S., 2018. Characterization

of phytochemical profile and phytotoxic activity of *Mimosa pigra* L. Agric. Nat. Resour. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.06.005>

Lawson, S.K., Sharp, L.G., Powers, C.N., McFeeters, R.L., Satyal, P., Setzer, W.N., 2020. Volatile compositions and antifungal activities of native american medicinal plants: Focus on the asteraceae. Plants. <https://doi.org/10.3390/plants9010126>

Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 682, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

Luber, J., Palmieri, M.J., Botelho, C.M., Rinaldo, D., Andrade-Vieira, L.F., 2015. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca Sativa*. An. Acad. Bras. Cienc. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140286>

Marchaim, U., Werker, E., Thomas, W.D.E., 1974. Changes in the Anatomy of Cotton Seed Coats Caused by Lucerne Saponins. Bot. Gaz. <https://doi.org/10.1086/336742>

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genet. Mol. Biol. 29, 148–158. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>

Matos, F.J.A., 2009. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3ª edição, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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., 2014. Evaluation of the antimutagenic activity and

mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. Genet. Mol. Res. <https://doi.org/10.4238/2014.February.14.14>

McHugh, M.L., 2011. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. Biochem. Medica. <https://doi.org/10.11613/bm.2011.029>

Mizushima, Y., Akihisa, T., Ukiya, M., Hamasaki, Y., Murakami-Nakai, C., Kuriyama, I., Takeuchi, T., Sugawara, F., Yoshida, H., 2005. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. Life Sci. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.022>

Molish, H., 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. Allelopatie. Fischer, Jena.

Moreland, D.E., Novitzky, W.P., 1987. Effects of Phenolic Acids, Coumarins, and Flavonoids on Isolated Chloroplasts and Mitochondria. <https://doi.org/10.1021/bk-1987-0330.ch023>

Mori, S.A., Boom, B.M., Carvalino, A.M., Santos, T.S., 1983. Ecological Importance of Myrtaceae in an Eastern Brazilian Wet Forest. Biotropica. <https://doi.org/10.2307/2388002>

Niu, Y., Wang, Y., Li, P., Zhang, F., Liu, H., Zheng, G., 2013. Drought stress induces oxidative stress and the antioxidant defense system in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Acta Physiol. Plant. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1158-9>

Peguero, G., Lanuza, O.R., Savé, R., Espelta, J.M., 2012. Allelopathic potential of the neotropical dry-forest tree *Acacia pennatula* Benth.: Inhibition of seedling establishment exceeds facilitation under tree canopies. Plant Ecol. <https://doi.org/10.1007/s11258-011-0014-0>

Pellissier, F., 2013. Improved germination bioassays for allelopathy research. Acta

Physiol. Plant. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1044-5>

Pinheiro, P.F., Queiroz, V.T. de, Rondelli, V.M., Costa, A.V., Marcelino, T. de P., Pratisoli, D., 2013. Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciência e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542013000200004>

Pires, N.D.M., & Oliveira, V.R., 2011. Alelopatia. In: DE OLIVEIRA JR, R. S., CONSTANTIN, J., & INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*.

Prates, H.T., Paes, J.M.V., De Pires, N.M., Pereira Filho, I.A., Magalhães, P.C., 2000. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. *Pesqui. Agropecu. Bras.* <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2000000500007>

Ravi Kiran, S., Sita Devi, P., 2007. Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0485-z>

Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A., González, L., 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0735-2689\(99\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0735-2689(99)00392-5)

Rice, E.L., 1979. Allelopathy-An update. *Bot. Rev.* <https://doi.org/10.1007/BF02869951>

Rice, E.L., 1984. *Allelopathy*. Academic Press, London, UK.

Salazar, G.J.T., de Sousa, J.P., Lima, C.N.F., Lemos, I.C.S., da Silva, A.R.P., de Freitas, T.S., Coutinho, H.D.M., da Silva, L.E., Amaral, W., Deschamps, C., 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crops Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.052>

- Santos, F.E., Carvalho, M.S.S., Silveira, G.L., Correa, F.F., Cardoso, M. das G., Andrade-Vieira, L.F., Vilela, L.R., 2019a. 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, 27558–27568. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1015-x>
- Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros, J.L., Sacchetti, G., Guerrini, A., 2017. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (myrtaceae) essential oil from amazonian Ecuador: A chemical characterization and bioactivity profile. Molecules. <https://doi.org/10.3390/molecules22071163>
- Scrivanti, L.R., Anton, A.M., 2019. Allelopathic effect of endemic South American *Bothriochloa* species (Poaceae: Andropogoneae). J. Essent. Oil Res. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1563569>
- Seal, A.N., Pratley, J.E., Haig, T.J., An, M., Wu, H., 2010. Plants with phytotoxic potential: Wollemi pine (*Wollemia nobilis*). Agric. Ecosyst. Environ. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.08.009>
- Setzer, W., Schmidt, J., Noletto, J., Vogler, B., 2006. Leaf oil compositions and bioactivities of abaco bush medicines. Pharmacol. online.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, Mehdi, Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, Marzieh, Loizzo, M.R., Oluwaseun Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S.A., Iriti, M., 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. Molecules. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- Shirley, B.W., 1996. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. Trends in plant science, 1(11), 377-382.

- Silva, Í.F., & Vieira, E.A., 2019. Phytotoxic potential of *Senna occidentalis* (L.) Link extracts on seed germination and oxidative stress of Ipê seedlings. *Plant Biology*, 21(4), 770-779.
- Silveira, G.L., Gabriela, M., Lima, F., Barreto Dos Reis, G., Jos E Palmieri, M., Fonseca Andrade-Vieria, L., 2017b. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere* 178, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>
- Smith, A.E., 1989. The Potential Allelopathic Characteristics of Bitter Sneezeweed (*Helenium amarum*) . *Weed Sci.* <https://doi.org/10.1017/s004317450007260x>
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Gniazdowska, A., Sliwinska, E., Bogatek, R., 2011. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1429-5>
- Sousa, S.M., Silva, P.S., Campos, J.M.S., Viccini, L.F., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of verbenaceae. *Caryologia* 62, 326–333. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589698>
- Souza, T.S., Ferreira, M.F.S, Menini, L., Souza, J.R.C.L, Parreira, L.A., Cecon, P.R., Ferreira, A., 2017. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.026>
- Souza Filho, A.P.S., Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhon, G.M.P., Santos, A.S., Arruda, M.S.P., Muller, A.H., Arruda, A.C., 2006. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400005>
- Stefanello, M.É.A., Cervi, A.C., Wisniewski, A., Simionatto, E.L., 2010. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var.

obtecta, Myrtaceae. Brazilian J. Pharmacogn. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100017>

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. max, Murphy, A., 2017. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal, Artmed. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32304-1_19

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

Trnková, L., Ricci, D., Grillo, C., Colotti, G., & Altieri, F., 2013. Green tea catechins can bind and modify ERp57/PDIA3 activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(3), 2671-2682.

Tukey, H.B., 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. Bot. Rev. <https://doi.org/10.1007/BF02859885>

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., 2019. 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05912-6>

Viard-Crétat, F., Baptist, F., Secher-Fromell, H., Gallet, C., 2012. The allelopathic effects of *Festuca paniculata* depend on competition in subalpine grasslands. Plant Ecol. <https://doi.org/10.1007/s11258-012-0143-0>

Von Mühlen, C., 2009. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. Sci. Chromatogr.

Wang, C., Zhu, M., Chen, X., Bo, Q., 2011. Review on allelopathy of exotic invasive plants, in: Procedia Engineering. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.038>

Wardle, D.A., 1987. Allelopathy in the New Zealand grassland/pasture ecosystem. New Zealand journal of experimental agriculture, 15(2), 243-255.

Weir, T.L., Park, S.W., Vivanco, J.M., 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>

Yoshida, N., Kuriyama, I., Yoshida, H., Mizushima, Y., 2013. Inhibitory effects of catechin derivatives on mammalian DNA polymerase and topoisomerase activities and mouse one-cell zygote development. *J. Biosci. Bioeng.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.10.001>

Zimdahl, R.L., 2018. *Fundamentals of Weed Science: Fifth Edition, Fundamentals of Weed Science: Fifth Edition.*

Zucker, W.V., 1983). Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist*, 121(3), 335-365.