



## Bioatividade de extratos etanólico e aquoso de folhas e flores *Schinus terebinthifolia* Raddi sobre bioindicador vegetal

Bioactivity of ethanolic and aqueous extracts of leaves and flowers *Schinus terebinthifolia* Raddi on plant bioindicator

N. F. da Rosa<sup>1</sup>; V. L. Bobrowski<sup>2\*</sup>; R.A. Freitag<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, 96010-000, Pelotas-RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB, Universidade Federal de Pelotas, 96010-000, Pelotas-RS, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96010-000, Pelotas-RS, Brasil

\*vera.bobrowski@ufpel.edu.br

(Recebido em 25 de maio de 2023; aceito em 05 de dezembro de 2023)

A aroeira mansa (*Schinus terebinthifolia* Raddi) é uma espécie nativa da América do Sul, com ampla distribuição na costa brasileira e tem sido avaliada quanto as suas atividades biológicas, mas seu uso requer cautela devido à sua toxicidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos fisiológicos, fitotóxicos, citotóxico e genotóxico de extrato etanólico e aquoso de folhas e flores de aroeira mansa sobre o bioindicador vegetal alface. Os bioindicadores vegetais apresentam vantagens como baixo custo, sensibilidade e reprodutibilidade. Para o bioensaio foram utilizadas 5 repetições de 50 sementes de alface para cada concentração dos diferentes extratos (5 mg·mL<sup>-1</sup>, 10 mg·mL<sup>-1</sup>, 20 mg·mL<sup>-1</sup>, 40 mg·mL<sup>-1</sup>) e água destilada como controle negativo. Para análise do efeito alelopático e fitotóxico, as variáveis foram respectivamente germinação inicial e final, comprimento de parte aérea e radicular. Para análise do efeito cito e genotóxico, lâminas com células meristemáticas foram preparadas pela técnica de esmagamento, coradas com orceína acética e analisadas em microscópio óptico através da técnica de varredura, contando 5000 células/tratamento. Foram calculados o índice mitótico (IM) avaliando-se as células em diferentes fases da mitose e o índice de anormalidades cromossômicas (IAC) em células em divisão ativa. Observou-se atividade alelopática, fitotóxica e citotóxica dos extratos etanólicos e aquosos de folhas e de flores de aroeira mansa nas concentrações mais altas (20 e 40 mg·mL<sup>-1</sup>) e atividade genotóxica dos extratos etanólicos de folhas e de flores na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup>. Conclui-se que estes extratos têm potencial para estudos como insumos na agricultura.

Palavras-chave: extrato, aroeira mansa, *Lactuca sativa*.

Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi) is a species native to South America, widely distributed along the Brazilian coast and has been evaluated for its biological activities, but its use requires caution due to its toxicity. In this context, the objective of this work was to evaluate the physiological, phytotoxic, cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic and aqueous extract of leaves and flowers of of Brazilian piper on lettuce vegetable bioindicator. Plant bioindicators have advantages such as low cost, sensitivity and reproducibility. For the bioassay 5 repetitions of 50 lettuce seeds were used for each concentration of the different extracts (5 mg·mL<sup>-1</sup>, 10 mg·mL<sup>-1</sup>, 20 mg·mL<sup>-1</sup>, 40 mg·mL<sup>-1</sup>) and distilled water as a negative control. To analyzethe allelopathic and phytotoxic effect, the variables wereinitial and final germination, shoot and root length. For analysis of the cytotoxic and genotoxic effect, slides with meristematic cells were prepared using the crushing technique, stained with acetic orcein and analyzed under an optical microscope using the scanning technique, counting 5000 cells/treatment. The mitotic index (MI) was calculated by evaluating cells at different stages of mitosis and the chromosomal abnormality index (CAI) in actively dividing cells. Allelopathic, phytotoxic and cytotoxic activity of ethanolic and aqueous extracts of leaves and flowers of Brazilian pepper was observed at the highest concentrations (20 and 40 mg·mL<sup>-1</sup>) and genotoxic activity of ethanolic extracts of leaves and flowers at a concentration of 20 mg·mL<sup>-1</sup>. It is concluded that these extracts have potential for studies to apply in agriculture.

Key-words: extract, brazilian pepper, *Lactuca sativa*.

## 1. INTRODUÇÃO

A aroeira mansa (*Schinus terebinthifolia* Raddi) é uma árvore frondosa, de casca fina e escamosa. Possui folhas compostas por folíolos lanceolados e pontiagudos, numerosas flores, dispostas em pedículos, pequenas e brancas ou amarelo esverdeadas. O fruto é drupa vermelha e lustrosa, cujo cheiro se assemelha ao da pimenta [1]. Conhecida também como aroeira vermelha, aroeira da praia, aroeira pimenteira é uma espécie nativa da América do Sul, tendo ampla distribuição no Brasil (por todo o litoral do sul, sudeste, centro-oeste e nordeste) [2].

Apesar do uso popular generalizado como planta medicinal, a aroeira mansa tem mostrado grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos para utilização na pecuária e na agricultura. Embora muitos estudos tenham avaliado as propriedades farmacológicas dessa planta, pouca atenção tem sido dada à identificação e quantificação de seus compostos químicos em diferentes tipos de extratos, sendo que a identificação de novos compostos e a correlação com as propriedades biológicas é certamente um nicho que precisa ser explorado [2].

Pesquisadores e agricultores têm buscado por produtos bioativos a base de extratos ou óleo essencial de plantas que possam reduzir o uso de herbicidas, inseticidas e outros pesticidas, reduzindo a poluição ambiental e diminuindo os riscos de toxicidade a seres humanos e animais em substituição aos agroquímicos sintéticos que normalmente possuem alta toxicidade, efeitos colaterais em humanos e animais, além de requerer longo período para a completa degradação [3-5]. Esses princípios bioativos, chamados aleloquímicos, são metabólitos secundários das plantas e podem estar presentes em todos os órgãos das plantas (folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes) [6]. Alguns aleloquímicos extraídos das raízes ou brotações das plantas inibem ou estimulam diretamente o crescimento e desenvolvimento de outras plantas, assim como de algumas plantas extrai-se substâncias com efeitos inseticidas que agem sobre insetos adultos, matando ou induzindo à inibição completa da atividade alimentar das pragas [7, 8].

Menezes-Filho (2020) [9] traz importantes relatos sobre os aspectos químicos e fitoquímicos de *S. terebinthifolia* que demonstram que há uma variação significativa de compostos químicos relacionados ao tipo de órgãos da planta utilizados na obtenção do extrato. Alguns compostos químicos têm sido associados a ação alelopática sendo eles os grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas [10]. Destes os terpenóides, fenóis e flavonóides têm sido citados como compostos que mais estão presentes em extratos de *S. terebinthifolia* [2, 8].

Bioensaios vegetais têm sido amplamente utilizados nas análises de efeito biológico visando o monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas ao ambiente. Sistemas de avaliação toxicológica utilizando bioindicadores vegetais como *Lactuca sativa* L., possuem muitas vantagens como: a facilidade na realização do ensaio, baixo custo, sensibilidade na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos (existindo espécies mais sensíveis que outras), reprodutibilidade do experimento, ausência de sazonalidade, sementes facilmente adquiridas no comércio, pequeno volume de amostra, rápida germinação e por terem boa correlação com outros sistemas testes, principalmente mamíferos [11, 12]. Segundo Ferreira e Áquila (2000) [13] para ser utilizada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme.

Diversos parâmetros podem ser avaliados pelos bioensaios vegetais visando investigar os efeitos tóxicos dos compostos e/ou substâncias químicas testadas, sendo os mais comumente analisados as taxas de germinação inicial e final e o índice de velocidade de germinação [14-16]. Porém, existem outros parâmetros, como exemplo, massa fresca, massa seca, tempo médio de germinação, alongamento da parte aérea e sistema radicular, número de sementes mortas e sementes não germinadas, entre outros, além de parâmetros genéticos como índice mitótico e anormalidades cromossômicas [15, 16].

Fiskesjö (1993) [17] e (1994) [18] destacou a importância e a utilidade dos sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e ressaltou algumas semelhanças em detrimento das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais. A análise de alterações cromossômicas e de ciclo celular em plantas como teste de mutagenicidade é uma das técnicas diretas para mensurar os danos em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais [19]. A amostra deve estar em constante divisão mitótica para a avaliação dos efeitos e danos que os

agentes mutagênicos possam causar, visando caracterizar os efeitos tóxicos e as alterações ao longo de um ciclo celular, para os quais testes com alface ou cebola têm sido amplamente empregados [20, 21].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos alelopático, fitotóxico, citotóxico e genotóxico entre os extratos etanólicos obtidos a partir de folhas e de flores de aroeira mansa (*Schinus terebinthifolia* Raddi) sobre sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) como bioindicador e da mesma forma o efeito de extratos aquosos obtidos a partir de folhas e de flores.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

### 2.1 Material botânico

Foram coletadas folhas e flores de aroeira mansa de árvores adultas localizadas no campus universitário do Capão do Leão UFPel, no município de Capão do Leão – RS, Brasil, latitude 31°48'05.1"S e longitude 52°24'54.5"W durante o mês de fevereiro de 2019. Um exemplar da espécie foi herbarizado e depositado no Herbário Pel do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas sob número PEL27.072.

### 2.2. Obtenção dos extratos

O material foi triado, separando-se manualmente folhas e flores, e levado ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel). Para secagem do material utilizou-se estufa com circulação de ar a uma temperatura de 37 °C, as folhas e as flores foram secas separadamente, e posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho de facas para produção do extrato.

#### 2.2.1 Extração Etanólica

O extrato etanólico bruto foi obtido acondicionando-se em balão de 250 mL, 15 g de folhas ou flores frescas conforme o extrato a ser produzido e 150mL de etanol PA. A solução foi mantida sob agitação constante em placa de aquecimento com banho de óleo a uma temperatura de 60 °C por 24 horas [22].

Posteriormente, o extrato foi filtrado e o solvente retirado completamente por evaporação utilizando-se um rotaevaporador [23]. Os extratos brutos prontos foram armazenados em frascos identificados, hermeticamente selados e conservados a -4 °C para posterior diluição e utilização.

#### 2.2.2 Extração Aquosa

O extrato aquoso de folha foi obtido acondicionando-se em balão de 250 mL, 15 g de folhas ou flores conforme o extrato a ser produzido e 150 mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação constante em placa de aquecimento com banho de óleo a uma temperatura de 60 °C por 24 horas da mesma forma que para o extrato etanólico [22]. Foi realizada decantação e posterior filtração, e então liofilizadas para retirada do solvente. O extrato bruto liofilizado foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados, identificados e conservados a -4 °C para posterior diluição e utilização.

### 2.3 Biotestes

Como bioindicador vegetal foram utilizadas sementes de alface cultivar Elisabeth, acondicionadas em embalagem hermeticamente fechadas, compradas no comércio local, sem defensivos, dentro do prazo de validade e submetidas a resfriamento de 4 °C por no mínimo 72 h, para superação da dormência. As embalagens foram abertas no momento da instalação do experimento para o posicionamento das sementes nas 85 placas de Petri (12 cm de diâmetro) forradas com papel germiteste umedecido com 2 mL de extrato. Para todos os extratos testados (extrato etanólico de folha, extrato etanólico de flor, extrato aquoso de folha e extrato aquoso de flor), as concentrações utilizadas foram 5 mg·mL<sup>-1</sup>, 10 mg·mL<sup>-1</sup>, 20 mg·mL<sup>-1</sup> e 40 mg·mL<sup>-1</sup> e água destilada como controle negativo.

Foram utilizadas cinco repetições de 50 sementes, para cada concentração de extrato e do controle. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Após a semeadura, placas foram transferidas para câmara de germinação com temperatura controlada de 25 ± 1 °C, mantidas por sete dias, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) [24]. Para análise alelopática foram avaliadas a primeira contagem de germinação, aos quatro dias após a semeadura, e a contagem de germinação final, aos sete dias. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2mm de protusão radicular [24].

A fitotoxicidade foi avaliada pelo crescimento da parte aérea (PA) e da parte radicular (PR), sendo que para obtenção dos valores utilizou-se régua milimetrada e os resultados expressos em centímetros. A avaliação foi realizada aos sete dias após a semeadura, sendo analisadas dez plântulas de cada repetição, escolhidas de forma aleatória.

Para a análise de citotoxicidade e genotoxicidade foram coletadas aleatoriamente, de cada tratamento, 10 pontas de raízes por repetição quando atingiram entre 0,5 e 1,0 cm. Estas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 h a temperatura ambiente e, posteriormente, acondicionadas em congelador até serem analisadas. Para análise foi empregada a técnica de esmagamento e visualização por varredura em microscópio óptico [25]. A preparação do material para análise foi realizada na seguinte ordem: imersão em água destilada por cinco minutos, transferência para HCl 5N por 10 minutos à temperatura ambiente e imersão novamente em água destilada por cinco minutos.

Após este procedimento as raízes foram transferidas para lâmina, adicionada orceína acética 2%, realizada a maceração do material com bastão de vidro conforme descrito por Guerra e Souza (2002) [25], coberta com uma lamínula e observadas em microscópio óptico a uma magnitude de 400x. Foram preparadas 10 lâminas por tratamento e analisadas 5000 células por concentração.

A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo de índice mitótico (IM), o qual foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observadas multiplicado por 100, através da seguinte expressão:

$$IM = \frac{NCM \cdot 100}{NTC}$$

Onde: IM = índice mitótico; NCM = número de células em mitose; NTC = número total de células observadas.

Para determinar a genotoxicidade, foi utilizado o índice de alterações cromossômicas (IAC), sendo consideradas as alterações nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como c-metáfase, anáfase multipolar, quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos. O IAC foi obtido pelo número de células com alterações cromossômicas em relação ao número de células observadas multiplicado por 100, através da seguinte expressão:

$$IAC = \frac{NCAC \cdot 100}{NTC}$$

### NTC

Onde: IAC = índice alterações cromossômicas; NCAC = número de células com alterações cromossômicas; NTC = número total de células observadas.

Os dados foram submetidos à análise de normalidade residual, e atendendo as pressuposições foi realizada a análise de variância 2-way (ANOVA) e a comparação múltipla das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para essas análises foi utilizado o programa Statistix 9® e os gráficos elaborados utilizando Microsoft Excel®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise de efeitos fisiológicos

A análise de germinabilidade é muito utilizada em estudos alelopáticos, no entanto também podem ocorrer alterações no padrão de germinação, alterando sincronia e velocidade da germinação [26].

A análise estatística dos resultados do efeito do extrato etanólico de folhas e de flores de *S. terebinthifolia* mostrou interação significativa entre os fatores tipos de explante utilizados na extração e concentração dos extratos. Os efeitos do extrato etanólico de folha de aroeira mansa sobre a germinação inicial de sementes de alface (Figura 1A) nos permitem observar que a germinação inicial no tratamento controle (99,6%) foi estatisticamente similar às concentrações menores de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (99,2%) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (89,6%). Enquanto a concentração intermediária de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (41,6%) inibiu a germinação aos 4 dias após a semeadura, diferindo estatisticamente tanto das concentrações menores e do controle quanto da concentração mais alta, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (8%), que causou grande inibição da germinação e diferiu das demais concentrações. Os percentuais de germinação final (Figura 1B) deste mesmo extrato nas concentrações testadas apresentaram o mesmo resultado estatístico, porém com médias de 99,6; 100; 93,6; 60 e 27,2%, respectivamente.

Dentro do fator concentração os percentuais de germinação iniciais no bioensaio com aplicação do extrato etanólico de flor (Figura 1A) foram: para o controle 99,6%, sendo estatisticamente igual às concentrações menores, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (100%) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (96,8%). Enquanto a concentração de 20mg·mL<sup>-1</sup> (46,8%), diferiu estatisticamente tanto das concentrações menores e do controle quanto da concentração mais alta. A concentração mais elevada, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (3%) diferiu estatisticamente das demais concentrações. A germinação final (Figura 1B) deste mesmo extrato apresentou o mesmo resultado estatístico, porém com médias de: 99,6; 100; 99,6; 75,6 e 25,2%, respectivamente.

Na comparação do efeito do tipo de explante utilizado para obtenção do extrato etanólico podemos observar que na germinação final o fator explante apresentou diferença estatística significativa na concentração de 20 mg. mL<sup>-1</sup>, sendo que o extrato obtido a partir de folhas se mostrou com maior potencial de inibição de germinação que aquele obtido de flores (Figura 1B).

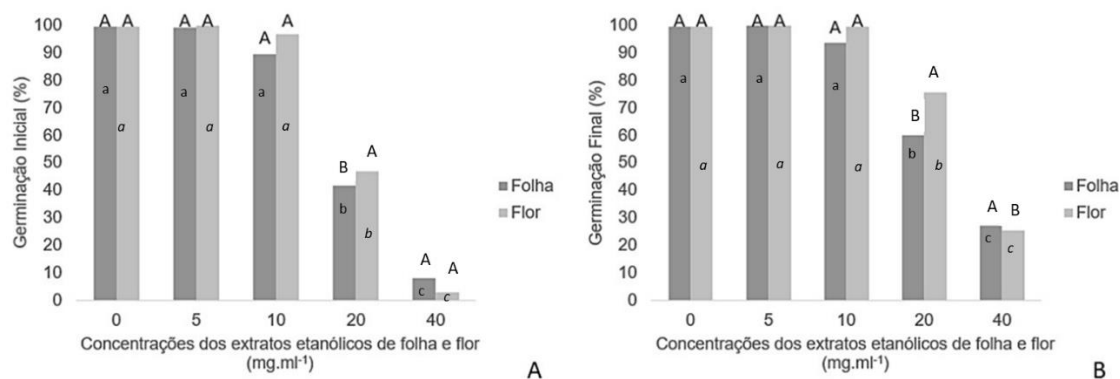


Figura 1 – Análises de germinação inicial (A) e final (B) de sementes expostas ao extrato etanólico de folha e de flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tipos de explante (folha e flor) utilizado na extração etanólica dentro de cada concentração utilizada. \*\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato etanólico dentro do fator explante folha. \*\*\* Letras minúsculas em itálico diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato etanólico dentro do fator explante flor.

A análise estatística dos resultados do efeito do extrato aquoso de folhas e de flores de *S. terebinthifolia* mostrou interação significativa entre os fatores tipos de explante utilizados na extração e concentração dos extratos (Figura 2). As médias de germinação inicial (Figura 2A) e final (Figura 2B) de sementes expostas ao extrato aquoso de folhas e de flores de *S. terebinthifolia*, e podemos observar que apenas na germinação inicial o fator explante apresentou diferença estatística significativa, sendo que na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> o extrato obtido a partir de folhas se mostrou com maior potencial de inibição de germinação que aquele obtido de flores (Figura 2A), o mesmo resultado pode ser observado na germinação final nas concentrações de 20 e 40 mg·mL<sup>-1</sup> (Figura 2B).

Com o desmembramento das médias dentro do fator concentração, podemos visualizar na Figura 2A que nas sementes sob influência do extrato aquoso de folha há igualdade estatística entre as taxas de germinação iniciais do controle (99,6%) e as concentrações mais baixas, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (97,6%) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (92,8%). Enquanto a concentração intermediária, 20 mg·mL<sup>-1</sup> (13,2%), apresentou grande inibição de germinação, diferindo estatisticamente tanto das concentrações baixas quanto das concentrações mais alta. A concentração mais alta, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0%), apresentou inibição total de germinação e diferiu estatisticamente das outras concentrações. Os percentuais de germinação finais (Figura 2B) deste mesmo extrato obtiveram o mesmo resultado estatístico, porém com médias de: 99,6; 99,2; 97,2; 32,4 e 0%, respectivamente.

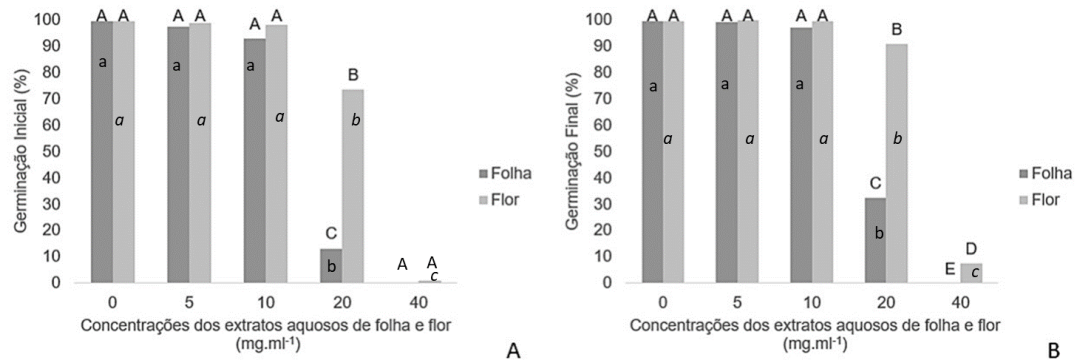


Figura 2 – Análises de germinação inicial (A) e final (B) de sementes expostas ao extrato aquoso de folha e de flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tipos de explante (folha e flor) utilizado na extração aquosa dentro de cada concentração utilizada. \*\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato aquoso dentro do fator explante folha. \*\*\* Letras minúsculas em itálico diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato aquoso dentro do fator explante flor.

Nas sementes sob influência do extrato aquoso de flor (Figura 2A) observou-se igualdade estatística entre as taxas de germinação do controle (99,6%) e as concentrações mais baixas, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (98,8%) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (98%). Enquanto a concentração intermediária, 20 mg·mL<sup>-1</sup> (73,6%), diferiu estatisticamente das concentrações mais baixas e da mais alta. A concentração mais alta, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,8%), apresentou inibição quase total de germinação, diferindo estatisticamente das outras concentrações. A germinação final (Figura 2B) em todas as concentrações testadas desde mesmo extrato apresentou o mesmo resultado estatístico, porém com médias de: 99,6; 100; 99,6; 90,8 e 7,6%, respectivamente.

Na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> houve diferença estatística significativa entre os extratos de folha e flor tanto para germinação inicial como para a germinação final, bem como na concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup> (Figura 2), quando avaliada a germinação final. Rozete et al. (2007) [10] e Simões et al. (2017) [27], relatam que os produtos químicos mais comuns causadores de efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas.. No extrato aquoso, onde observamos um efeito inibitório significativo na germinação em concentrações acima de 20 mg·mL<sup>-1</sup>.

Bitencourt et al. (2021) [28] analisando o efeito do extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* sobre sementes de alface obtiveram diferenças significativas na germinação inicial e final de sementes em função ao aumento da concentração do extrato, resultados também observados neste experimento para as concentrações mais altas.

Ao utilizar extratos de *S. molle*, planta da mesma família de *S. terebinthifolia*, Nogueira et al. (2021) [29] observaram que os extratos obtidos de diferentes explantes só apresentaram diferença estatisticamente significativa para germinação de alface nas concentrações de 20 e 40 mg·mL<sup>-1</sup>. E comparando os diferentes tipos de explantes utilizados, as maiores interferências para os extratos aquosos obtidos de folhas e inflorescências ocorreu na concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup>. Os mesmos resultados foram encontrados também com extratos aquosos de *S. molle* onde o efeito negativo sobre a germinação ocorreu para a concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup>, resultados similares aos obtidos neste experimento.

Tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso, observamos um efeito inibitório significativo na germinação em concentrações acima de 20 mg·mL<sup>-1</sup>, e este efeito foi mais pronunciado para extratos obtidos de folhas.

A extração aquosa simula as condições de lixiviação pela água da chuva, porém, a extração com etanol como solvente é mais eficaz para obtenção de metabólitos secundários e esse maior número de substâncias quando associadas otimizariam a atividade alelopática [30]. Mendes et al. (2020) [31] sugerem há necessidade de avaliação do melhor método de extração de acordo com

o objetivo de uso, e podemos enfatizar ainda que é sempre importante considerar também o efeito sinérgico dos compostos.

Efeitos fisiológicos negativos foram reportados sobre a germinação de sementes de alface utilizando extrato aquoso de *S. terebinthifolia*, sendo mais expressivo com aumento da concentração do extrato de forma similar aos resultados observados neste experimento [4, 32].

### 3.2 Análise de fitotoxicidade

A fitotoxicidade é o resultado da ação tóxica de compostos sobre diversos parâmetros como a inibição de crescimento de um organismo biomonitor vegetal e esse efeito no desenvolvimento que pode ser avaliado por análise macroscópica com observações métricas e visuais [33, 34].

A análise de variação para os resultados do desenvolvimento de parte aérea (PA) indicou que houve uma interação significativa entre os fatores tipo de explante utilizado para extração etanólica (flor e folha) e as concentrações utilizadas. A média de comprimento da parte aérea (PA) (Figura 3A) das plântulas sob influência do extrato etanólico de folha, em relação ao controle (3,196cm), foi reduzida significativamente desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,246cm). A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (1,584cm) causou maior redução em comparação à concentração menor, diferindo estatisticamente das outras concentrações do mesmo extrato. A concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (0,884cm) causou maior redução em comparação ao controle e as duas doses menores, diferindo estatisticamente das outras concentrações do mesmo extrato. A concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,132cm) reduziu significativamente o crescimento da PA das plântulas em comparação com as outras concentrações do mesmo extrato.

A média de comprimento da PA das plântulas sob influência do extrato etanólico de flor (Figura 3A), em relação ao controle (3,196cm), sofreu redução significativa desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,206cm). A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (1,502cm) causou redução significativa em relação ao controle e à concentração mais baixa, diferindo estatisticamente das demais concentrações. A concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (0,458cm) também causou redução de crescimento em relação às concentrações menores e o controle, também diferiu estatisticamente da concentração mais alta. A concentração mais alta, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,112cm), causou a maior redução da média de tamanho, diferindo estatisticamente das outras concentrações e do controle.

A média de comprimento da parte radicular (PR) (Figura 3B) das plântulas sob influência do extrato etanólico de folha, em relação ao controle (3,136cm), sofreu redução significativa desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,608cm). As concentrações de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (1,416cm) e 20 mg·mL<sup>-1</sup> (1,138cm), diferiram estatisticamente do controle, da concentração mais baixa e da concentração mais alta do mesmo extrato, porém não diferiram estatisticamente entre si. A concentração mais alta, 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,264cm) causou maior redução das médias, diferindo estatisticamente das outras concentrações do mesmo extrato.

A média de comprimento da PR das plântulas sob influência do extrato etanólico de flor (Figura 3B), em relação a controle (3,136cm), sofreu redução significativa desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,206cm). A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (1,068cm) causou redução significativa em relação ao controle e à concentração menor. As concentrações de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (0,312cm) e 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,16cm) causaram redução significativa em relação ao controle às doses menores, porém não diferiram entre si.

Tanto para a variável comprimento de parte aérea como para parte radicular observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os extratos etanólico de folhas e de flor na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup>, sendo que o extrato de flor causou uma redução de crescimento maior em ambas as variáveis (Figura 3).

Resultados semelhantes foram observados em ensaio utilizando *S. molle* avaliando o efeito de extratos etanólicos obtidos a partir de diferentes estruturas da planta. Quando comparados o extrato etanólico de folhas e flores dentro da mesma concentração, observaram uma redução maior na elongação radicular causada pelo extrato etanólico de folha. Ao analisarem dentro da mesma estrutura para obtenção do extrato verificaram que houve uma redução do crescimento da radícula conforme aumento da concentração tanto nos extratos obtidos de folhas como naqueles



obtidos a partir de flores, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para *S. terebinthifolia* [29].

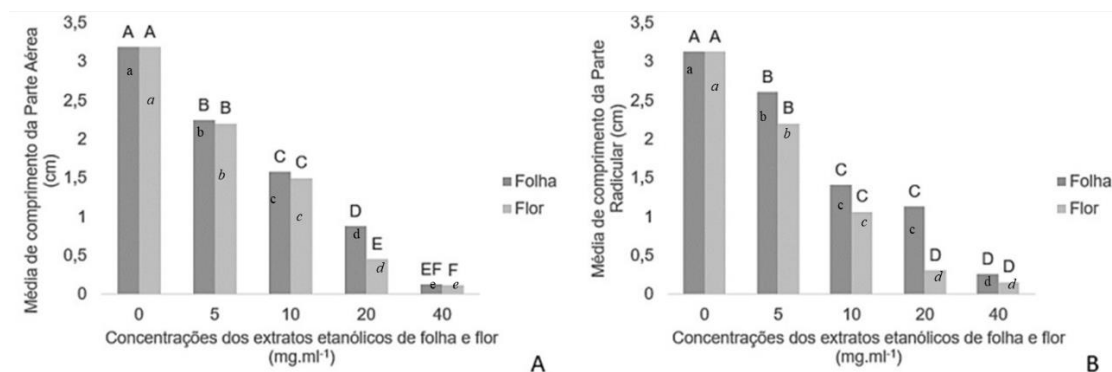


Figura 3 - Médias de comprimento da Parte Aérea (A) e Parte Radicular (B) de plântulas sob efeito de concentrações dos extratos etanólicos de folha e flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tipos de explante (folha e flor) utilizado na extração etanólica dentro de cada concentração utilizada. \*\*Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato etanólico dentro do fator explante folha. \*\*\*Letras minúsculas em itálico diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato etanólico dentro do fator explante flor.

Nas médias de comprimento da PA das plântulas sob influência do extrato aquoso de folha (Figura 4A), em relação ao controle (3,196cm), observou-se igualdade estatística com as concentrações de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,708cm) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (2,582), diferindo das concentrações elevadas. A concentração de 20mg·mL<sup>-1</sup> do extrato aquoso de folha (0,088cm) diferiu das demais. A concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup> inibiu a emissão de parte aérea e/ou germinação.

Na média de comprimento da PA de plântulas sob influência do extrato aquoso de flor (Figura 4A), em relação ao controle (3,196cm), observou-se igualdade estatística com a concentração de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (2,762cm). A concentração de 5 mg·mL<sup>-1</sup> foi estatisticamente igual à concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (2,28cm), embora esta última tenha sofrido redução significativa em relação ao controle. Na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (1,35cm) a redução da PA foi significativa em relação às concentrações anteriores e à concentração mais elevada. Não houve crescimento radicular na concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup>.

A média de comprimento da PR das plântulas sob influência do extrato aquoso de folha (Figura 4B), em relação ao controle (3,136cm), sofreu redução significativa desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (1,88cm). A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (1,066cm) provocou redução significativa tanto do controle quanto da concentração mais baixa. Na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (0,082cm) também houve redução significativa quando comparada às concentrações menores. Não houve crescimento radicular na concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup>.

A média de comprimento da PR das plântulas sob influência do extrato aquoso de flor (Figura 4B), em relação ao controle (3,136cm), sofreu redução significativa desde a concentração mais baixa, 5 mg·mL<sup>-1</sup> (1,718cm). A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (0,966cm) apresentou redução significativa quando comparada ao controle e a concentração mais baixa. A concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (0,4cm) também apresentou redução significativa quando comparado às concentrações menores. Não houve crescimento radicular na concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup>.

Apenas para PA, na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (Figura 4A) houve diferença estatística entre o extrato aquoso de folha e o extrato aquoso de flor, sendo que o extrato aquoso de flor reduziu menos o comprimento das plântulas.

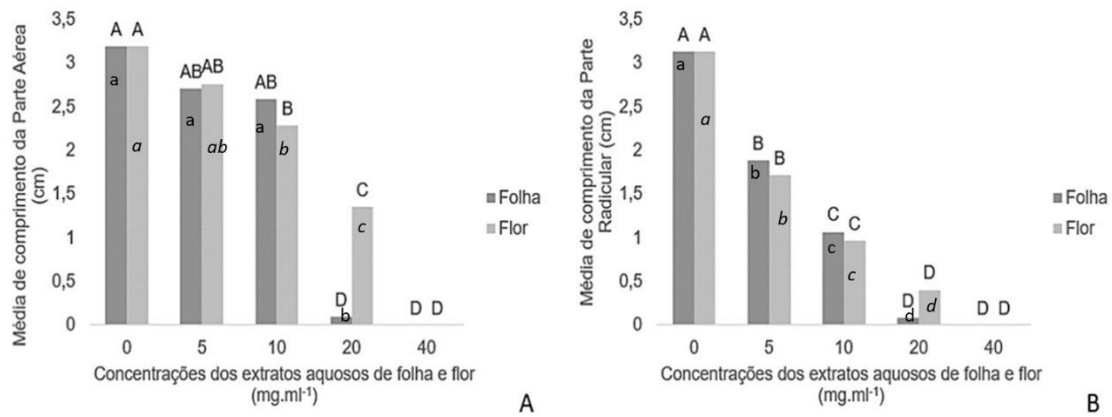


Figura 4 - Médias de comprimento da Parte Aérea (A) e Parte Radicular (B) de plântulas sob efeito de concentrações dos extratos aquosos de folha e flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tipos de explante (folha e flor) utilizado na extração aquosa dentro de cada concentração utilizada. \*\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato aquoso dentro do fator explante folha. \*\*\* Letras minúsculas em itálico diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey na comparação das diferentes concentrações do extrato aquoso dentro do fator explante flor.

Resultados semelhantes para redução no comprimento total de plântulas de alface submetidas a extrato aquoso de folhas frescas de *S. terebinthifolia* foram observados por Comiotto et al. (2012) [4] que indicaram a existência de uma fitotoxicidade bastante acentuada dos extratos aquosos de aroeira sobre a qualidade fisiológica dos aquênios de alface.

Em ensaio analisando o crescimento de parte aérea de *L. sativa*, os autores verificaram que o extrato aquoso de folhas de *S. terebinthifolia* promoveu interferência negativa em função do aumento da concentração, sugerindo que o extrato retardou crescimento das plântulas quando comparado ao controle, resultados similares aos encontrados nas doses mais altas deste experimento [28].

Fonseca et al. (2015) [32] trabalhando com concentrações maiores de extratos de *S. terebinthifolia* que as utilizadas neste trabalho verificaram que tanto sementes de alface tratadas com extrato aquoso de folha quanto com extrato de flores nas doses mais altas (50 e 100%) não possibilitaram o crescimento de PA nem de PR.

Nogueira et al. (2021) [29], analisando o efeito do extrato aquoso de *S. molle* de diferentes partes da planta, observaram que o extrato aquoso de folha causou uma redução significativa do crescimento de parte radicular conforme aumento da concentração, resultados também avaliados para extrato aquoso de flores, resultados estes semelhantes aos obtidos neste experimento. E quando comparados os extratos de folhas e flores dentro da mesma concentração só foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de 20 e 40 mg. mL<sup>-1</sup>, o que observamos na concentração de 20mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato aquoso de folhas.

Podemos considerar a efetiva ação alelopática de *Schinus terebinthifolia* a partir dos resultados observados, pois conforme Ferreira e Borghetti (2004) [35] “A alelopatia pode ser definida como a interferência positiva ou negativa de compostos metabólicos secundários produzidos por uma planta (aleloquímicos) e lançados no meio”, sendo os sintomas mais comuns o desenvolvimento anormal das plântulas, redução da germinação e necrose radicular [4, 13]. Neste trabalho foram verificados efeitos inibitórios tanto nas variáveis germinativas quanto nas de crescimento vegetativo, principalmente nas concentrações mais elevadas tanto do extrato etanólico como do aquoso de folhas e flores de *S. terebinthifolia*. Esses sintomas são observados e indicados como ação alelopática de *Schinus terebinthifolia* Raddi por vários autores [28, 32, 36].

### 3.3 Análise de citotoxicidade

O índice mitótico é um parâmetro indicativo da citotoxicidade de extratos, pois valores menores do que os do controle podem indicar citotoxicidade causada pelo tratamento [37], enquanto valores acima do controle podem indicar efeito proliferativo.

A análise estatística indicou que não houve diferença estatística entre os extratos de folha e flor na mesma concentração para a variável Índice Mitótico (IM). Na Figura 5 estão demonstrados os valores do índice que indicam igualdade estatística do controle (9,3%) com as concentrações de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (10,88%), 10 mg·mL<sup>-1</sup> (7,1%) e 20 mg·mL<sup>-1</sup> (7,76%) do extrato etanólico da folha. O IM na concentração de 5 mg·mL<sup>-1</sup> diferiu estatisticamente daquele de 10 mg·mL<sup>-1</sup> e de 40 mg·mL<sup>-1</sup> (2,4%), sendo que este último diferiu estatisticamente do controle.

A influência do extrato etanólico de flor (Figura 5) também apresentou igualdade estatística entre o controle (9,3%) e as concentrações de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (8,58%), 10 mg·mL<sup>-1</sup> (8,18%) e 20 mg·mL<sup>-1</sup> (6,24%). A concentração de 40mg·mL<sup>-1</sup> (3,6%) apresentou diminuição do IM, diferindo estatisticamente do controle e das concentrações de 5 mg·mL<sup>-1</sup> e 10 mg·mL<sup>-1</sup>, porém igualando-se à concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup>.

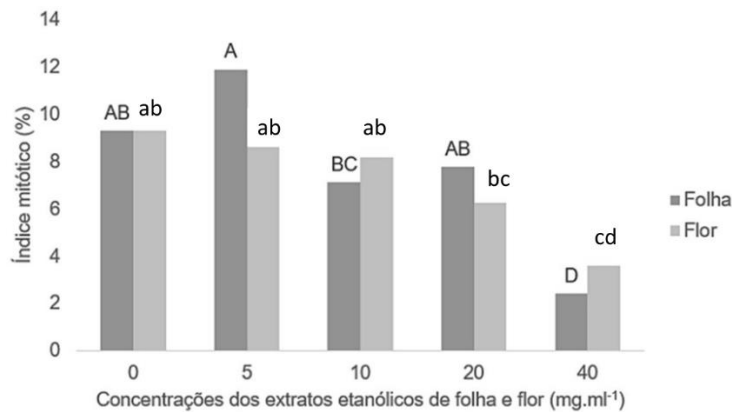


Figura 5 - Índice mitótico de células meristemáticas sob influência de extratos etanólicos de folha e de flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey do fator explante folha dentro do fator concentração. \*\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey do fator explante flor dentro do fator concentração.

Quando comparados os extratos aquosos de folha e flor, não se observou diferença estatística significativa dentro das mesmas concentrações. Em células sob influência do extrato aquoso de folha (Figura 6) também se observou igualdade estatística entre o controle (9,3%) e as concentrações de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (6,84%) e 10 mg·mL<sup>-1</sup> (7,6%). A concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> (3,6%) apresentou redução significativa do IM em relação aos anteriores. A concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0%) não apresentou células em divisão, tendo seu índice em 0%, diferindo estaticamente das outras concentrações do mesmo extrato. Em relação ao controle (9,3%), as células sob influência do extrato aquoso de flor (Figura 6) apresentaram igualdade estatística na concentração de 5 mg·mL<sup>-1</sup> (8,98%) em relação ao controle. A concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup> (4,96%) apresentou igualdade estatística com a concentração de 20mg·mL<sup>-1</sup> (3,8%), e ambas apresentaram redução significativa em relação ao controle e a concentração de 5 mg·mL<sup>-1</sup>. A concentração de 40 mg·mL<sup>-1</sup> (0,74%) apresentou redução significativa em relação ao controle e às outras concentrações do mesmo extrato.

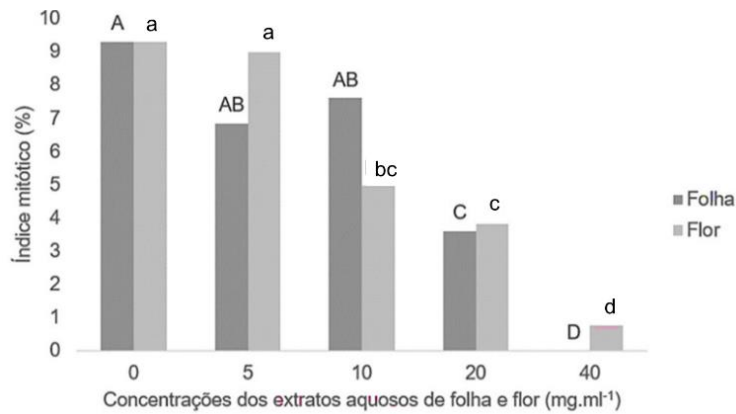


Figura 6 - Índice mitótico de células meristemáticas sob influência de extratos aquosos de folha e de flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com interação entre os fatores concentração e extratos. \*Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey do fator explante folha dentro do fator concentração. \*\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey do fator explante flor dentro do fator concentração.

Fonseca et al. (2015) [32] não obtiveram resultados estatisticamente diferentes para a variável índice mitótico quando analisou células meristemáticas radiculares de alface submetidas a tratamento com extrato aquoso de aroeira mansa. Porém, Pawlowski et al. (2012) [37] utilizando óleo essencial de duas espécies de aroeira (*S. molle* e *S. terebinthifolia*) observaram efeito citotóxico em células meristemáticas de cebola, sendo que aquelas expostas ao óleo de *S. terebinthifolia* foram mais afetadas apresentando poucas células em divisão.

Observou-se nas concentrações acima de 20mg.mL<sup>-1</sup> do extrato etanólico de folhas e de flores o índice mitótico (IM) sofreu uma redução significativa, menos de 50% quando comparado ao controle, o que de acordo com Fiskesjö (1985) [38] classifica um agente citotóxico; resultado similar para o extrato aquoso de flor na concentração de 40mg.ml<sup>-1</sup>.

### 3.5 Análise de genotoxicidade

Substâncias genotóxicas, citotóxicas e antimitóticas podem causar uma ampla variedade de efeitos sobre o material genético das células dos organismos expostos a estes agentes [39], por exemplo: fragmentar o DNA, induzir aberrações cromossômicas, retardar ou inibir a divisão celular [40].

Para os extratos aquosos de folha e flor de aroeira mansa, não houve diferença estatística significativa, sendo encontrado um percentual muito baixo de alterações em todas as concentrações, as quais não diferiram do controle, indicando baixa/nula genotoxicidade nas condições do experimento. Para os extratos etanólicos, não houve interação entre os fatores tipo de explante (folha e flor) e as concentrações. As alterações estatisticamente significativas foram observadas somente quando comparadas as concentrações dos extratos testados que seguem a mesma tendência. Na concentração mais alta não houve germinação significativa para proceder análise citogenética. Porém, observamos um aumento de IAC na concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>, mas não houve diferença em relação a concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, a qual não diferiu daquela de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e do controle (Figura 7).

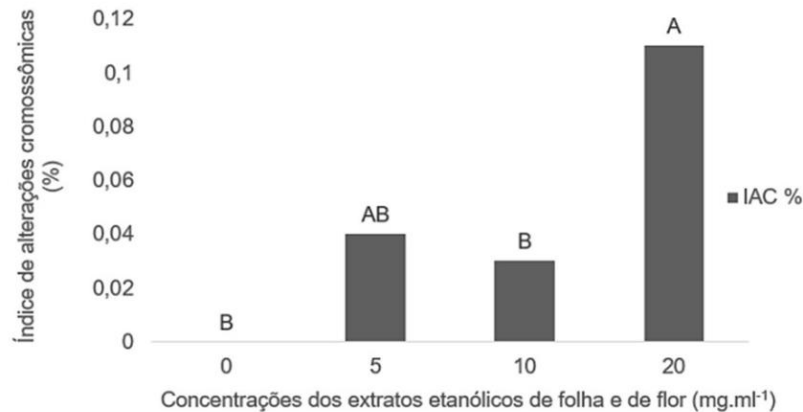


Figura 7 - Índice de alterações cromossômicas (IAC) em células sob efeito de diferentes concentrações dos extratos etanólicos de folha e flor de *Schinus terebinthifolia* Raddi, com diferença estatística significativa somente dentro do fator concentração. Rótulos de dados com mesma letra indicam igualdade estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As alterações cromossômicas observadas nas células meristemáticas de alface expostas ao extrato etanólico de folhas e de flor indicam uma ação genotóxica que pode ser decorrente do efeito de compostos alelopáticos presentes no extrato. Guarda et al. (2017) [41], ao estudarem a ação citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Punica granatum* L., relataram que compostos bioativos com atividades alelopáticas podem ser os principais responsáveis por danos no material genético, sugerindo que a presença de anáfases com pontes dentre outras alterações encontradas podem ser consequências da ação destes compostos.

O resultado dos extratos aquosos foi condizente com Taveira (2021) [26] que também não observou efeito genotóxico do extrato aquoso de folha sobre células meristemática radiculares de bioindicadores (alface e cebola). Em testes de genotoxicidade utilizando outros biomarcadores, como células de medula óssea de ratos Wistar, Terra Junior et al. (2015) [42] não observaram efeitos genotóxicos em todas as concentrações testadas de extrato aquoso de aroeira mansa.

Os ensaios genéticos com bioensaio de plantas são instrumentos importantes para detecção e classificação do mecanismo de ação celular da substância avaliada, isto é, avaliar se os danos causados são considerados do tipo aneugênico - aqueles que promovem alterações cromossômicas resultantes de danos a formação do fuso mitótico e que podem causar alterações cromossômicas numéricas, mas não atuam sobre a sequência do DNA, ou são do tipo clastogênicos como pontes, cromossomos fragmentados, micronucleos que alteram a sequência dos genes no cromossomo [43].

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram verificados efeitos inibitórios tanto nas variáveis germinativas quanto nas de crescimento vegetativo, principalmente nas concentrações mais elevadas de extratos etanólico e aquoso de folhas e flores de *S. terebinthifolia*, evidenciando-se atividade alelopática, fitotóxica e citotóxica dos extratos etanólicos e aquosos de folhas e de flores de aroeira mansa nas concentrações de 20 e 40 mg·mL<sup>-1</sup> e atividade genotóxica dos extratos etanólicos de folhas e de flores na concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup>.

As descobertas deste trabalho poderão constituir uma base para o conhecimento dos extratos testados. Porém, se faz necessário conhecer os compostos bioativos responsáveis pelos efeitos observados, assim como conhecer os efeitos em outros bioindicadores para avaliar a eficiência quando utilizado como bioativo natural com aplicações em agricultura e pecuária.

## 5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao prof. Maicon Nardino – UFV, pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos AC, Rossato M, Serafini LA, Bueno M, Crippa LB, Sartori VC, et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. Rev Bras Farmacogn. 2010 May;20(2):154-9. doi: 10.1590/S0102-695X2010000200003
2. Carvalho MG, Melo AGN, Aragão FCS, Raffin FN, Moura TFAL. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. Rev Bras Plantas Mediciniais. 2013 Apr;15(1):158-69. doi: 10.1590/S1516-05722013000100022
3. Borella J, Pastorini LH. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. Biotemas. 2009 Jun;22(3):67-75. doi: 10.5007/2175-7925.2009v22n3p67
4. Comiotto A, Moraes DM, Lopes, NF. Potencial alelopático de extratos aquosos de aroeira sobre germinação e crescimento de plântulas de alface. Sci Agrar Paranaensis. 2012 Jan;10(3):23-31. doi: 10.18188/sap.v10i3.4349
5. Šučur J, Popović A, Petrović M, Anačkov G, Bursić V, Kiproviski B, et al. Allelopathic effects and insecticidal activity of aqueous extracts of *Satureja montana* L. J Serb Chem Soc. 2015;80(4):475-84. doi: 10.2298/JSC020714106S
6. Farooq M, Jabran K, Cheema ZA, Wahid A, Siddique KH. The role of allelopathy in agricultural pest management. Pest Manag Sci. 2011 May;67(5):493-506. doi: 10.1002/ps.2091
7. Safari H, Tavili A, Saberi M. Allelopathic effects of *Thymus kotschyanus* on seed germination and initial growth of *Bromus tomentellus* and *Trifolium repens*. Front Agric China. 2010 Dec;4(4):475-80. doi: 10.1007/s11703-010-1030-x
8. Patocka J, Almeida JD. Brazilian pepper tree: Review of pharmacology. Mil Med Sc Lett. 2017 Dec;86(1):32-4. doi: 10.31482/mmsl.2017.005
9. Menezes-Filho ACP. *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*: Revisão sistemática da classificação, e aspectos químicos, fitoquímicos, biológicos e farmacobotânicos. Braz J Nat Sci. 2020 dez;3(3):490-513. doi: 10.31415/bjns.v3i2.109
10. Rozete FSS, Oliveira, Pagusman GS, Valentim JMB, Vestena S, Bittencourt AHC. Avaliação do Efeito alelopático de extratos aquosos de *Bacharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleraceae* L. Rev Bras Biociênc. 2007 Jul;5(S2):513-15.
11. Delarmelina JM, Batitucci MCP, Gonçalves JLO. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. Rev Cubana Plant Med. 2012 Jun;17(2):149-59.
12. Peduto TAG, de Jesus TA, Kohatsu MY. Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade. Rev Bras Ciênc, Tecnol e Inov. 2019;4(2):200-12.
13. Ferreira AG, Áquila MEA. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. Rev Bras Fisiol Veg. 2000;12(Edição Especial):175-204.
14. Cuchiara CC, Borges CS, Bobrowski VL. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. Tecnol Ciênc Agropecu. 2012 Mar;6(1):33-8.
15. Silveira BD, Hosokawa TR, Nogueira CA, Weber VP. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze allelopathic activity on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. Ciênc Florest. 2014 Jan-Mar;24(1):79-85. doi: 10.5902/1980509813325
16. Barbosa S, Moraes RM, dos Santos Filho PR, Carvalho M, Nogueira ML. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. Rev Bras Biocienc. 2015 Jun;13(2):115-21.
17. Fiskesjö G. The *Allium* test in wastewater monitoring. Environ Toxicol Water Quality. 1993 Ago;8(3):291-8. doi: 10.1002/tox.2530080306
18. Fiskesjö G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. Environ Toxicol Water Qual. 1994 Ago;9(3):235-41. doi: 10.1002/tox.2530090311
19. Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RT, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: Medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. Acta Sci Biol Sci. 2001 May;23(2):593-8. doi: 10.4025/actascibiolsci.v23i0.2716
20. Santos FE, Carvalho MS, Silveira GL, Correa FF, Cardoso MDG, Andrade-Vieira LF, et al. 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. 2018 Mar;26:27558-68. doi: 10.1007/s11356-017-1015-x
21. Carvalho MSS, Andrade-Vieira LF, Santos FE, Correa FF, Cardoso MG, Vilela LR. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. Sci Horticulturae. 2019 Feb;245:90-8. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.001
  22. Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza (CE): Ed. Imprensa Universitária UFC; 2009.
  23. Ndam LM, Mih AM, Fongod AGN, Tening AS, Tonjock RK, Enang JE, et al. Phytochemical screening of the bioactive compounds in twenty (20) Cameroonian medicinal plants. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014 Dec;3(12):768-78.
  24. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes Brasília (DF): MAPA; 2009. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf)
  25. Guerra M, Souza MJ. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto (SP): Funpec Editora; 2002.
  26. Taveira ALM, Santa Maria DT, Souza L, Mendonça IL, Corsato JM, Fortes AMT. Potencial alelopático de aroeira salsa (*Schinus molle* L.) e seus efeitos sobre o desenvolvimento inicial de sementes de milho (*Zea mays* L.). J Agron Sci. 2021;10(1):70-83.
  27. Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 7. ed. Porto Alegre (RS): ArtMed Editora; 2017.
  28. Bitencourt GA, Gonçalves CCM, Rosa AG, Zanella DFP, Matias R. Fitoquímica e alelopatia da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na germinação de sementes. Ensaios e Ciência. 2021;25(1):02-8. doi: 10.17921/1415-6938.2021v25n1p02-08
  29. Nogueira ML, Campos NA, Santos SC, Beijo LA, Barbosa S. The species used in urban afforestation can present phytotoxicity - a case of study of *Schinus molle* L. Ciênc Florest. 2021 Jan/Mar;31(1):66-84.
  30. Cecchin K., Favaretto A, Scheffer-Basso SM, Bertol CD, Chini SO Allelopathy and allelochemicals of *Eragrostis plana* (Poaceae) and its relation with phenology and nitrogen fertilization. Planta Daninha. 2017;35:e017157907.
  31. Mendes FLR, Carvalho EM, Abrantes JA, Nogueira JMR Buscando novos antimicrobianos: Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. RBAC. 2020;52(3):228-34
  32. Fonseca VB, Tavares VRS, Gonçalves VM, Freitag RA, Bobrowski VL. Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. Científica. 2015 Dez;44(1):35-9. doi: 10.15361/1984-5529.2016v44n1p35-39
  33. Blok C, Baumgarten A, Baas R, Wever R, Lohr D. Analytical methods used with soilless substrates. In: Raviv M, Heinrich-Lieth J, Bar-Tal A, editors. Soilless Culture: Theory and practice. 2nd ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier Academic Press; 2019. p. 509-64. doi: 10.1016/B978-0-444-63696-6.00011-6
  34. Vieira C, Marcon C, Droste A Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on *Lactuca sativa* L. Braz J Biol. 2024;84:e257039. doi: 10.1590/1519-6984.257039
  35. Ferreira AG, Borghetti F. Germinação: Do básico ao aplicado. Porto Alegre (RS): Artmed; 2004.
  36. Bigaton D, Bacchi LMA, Formagio ASN, Gavassoni WL, Zanella CS. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. Rev Ciência Agron. 2013 Out-Dez;44(4):757-63.
  37. Pawlowski Â, Kaltchuk-Santos E, Zini CA, Caramão EB, Soares GLG. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. South Afr J Bot. 2012 May;80:96-103. doi: 10.1016/j.sajb.2012.03.003
  38. Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. Hereditas. 1985;102:99-112.
  39. Quispe J, Saldaña J, Verde T, Valderrama S. Efectos del sorbato de potasio a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre el ciclo celular y el material genético en meristemas radiculares de *Allium cepa* L. (cebolla). Rev ECIPerú. 2010;7(1):71-8. doi: 10.33017/RevECIPeru2010.0011/
  40. Barbério A, Barros L, Voltolini JC, Mello MLS. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. Braz J Biol. 2009 Aug;69(3):837-42. doi: 10.1590/S1519-69842009000400010
  41. Guarda A, Giustina LD, Rocha VD, Rossi AAB. Alelopatic and citotoxic activity of the aqueous extract of *Punica granatum* L. (Lythraceae). Sci Amazonia. 2017 Jul;6(3):46-52.
  42. Terra Junior ON, Maldonado GC, Alfradique GR, Arnóbio A. Study of acute genotoxic potential of an aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi: An in vivo micronucleus assay. Adv Stud Biol. 2015;7(8):351-64. doi: 10.12988/asb.2015.5420

43. Leme DM, Marin-Morales MA. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res Rev.* 2009;682(1):71-81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002