

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Martins Rocha

**AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E
CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO
BRUTO DE *Mimosa caesalpinifolia* BENTH.
NO BIOMODELO VEGETAL *Lactuca sativa* L.**

**Juiz de Fora
2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Martins Rocha

**AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E
CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO
BRUTO DE *Mimosa caesalpinifolia* BENTH.
NO BIOMODELO VEGETAL *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa

**Juiz de Fora
2022**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MARTINS ROCHA, CAMILA.

AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE *Mimosa caesalpiniiifolia* BENTH. NO BIOMODELO VEGETAL *Lactuca sativa* L. / CAMILA MARTINS ROCHA. -- 2022.

57 f. : il.

Orientador: SAULO MARÇAL DE SOUSA

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. ALELOPATIA. 2. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS. 3. SANÇÃO-DO-CAMPO. 4. CITOMETRIA DE FLUXO. 5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. I. MARÇAL DE SOUSA, SAULO, orient. II. Título.

Camila Martins Rocha

**AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE
Mimosa caesalpinifolia BENTH. NO BIOMODELO VEGETAL Lactuca sativa L**

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 23 de novembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Elyabe Monteiro de Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Aryane Campos Reis
Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais

Juiz de Fora, 04/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Saulo Marcal de Sousa, Professor(a)**, em 23/11/2022, às 21:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aryane Campos Reis, Usuário Externo**, em 24/11/2022, às 10:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elyabe Monteiro de Matos, Usuário Externo**, em 25/11/2022, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1026192** e o código CRC **DBE7BF2C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pela minha vida e daqueles que amo, por me guiar e me manter no decorrer desse caminho

Aos familiares e amigos por todo apoio e incentivo que sempre me deram

Ao professor Saulo por me orientar e por toda compreensão e paciência para ensinar

Ao professor Paulo do Departamento de Botânica, ao doutorando Pedro e à professora Elita do Departamento de Bioquímica, por toda disponibilidade em nos ajudar

Ao pessoal do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelos conselhos, pela troca de experiência e pelos bons momentos compartilhados

E a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para que esse trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

A alelopatia é um fenômeno natural que envolve a liberação de compostos químicos que podem apresentar ação inibidora ou estimuladora em outros organismos. A espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth é considerada invasora e com potencial alelopático, assim, esse trabalho teve por objetivo realizar um estudo sobre a ação do extrato aquoso dessa espécie, em diferentes concentrações, na germinação e no ciclo celular do biomodelo vegetal *Lactuca sativa*. A partir do extrato bruto, ao qual utilizou-se 300g folhas frescas de *M. caesalpinifolia* em um litro de água destilada, foram preparadas as concentrações 25%, 50%, 75% e 100%. Para cada tratamento havia três placas de Petri com 100 sementes de alface que foram estabelecidas em DIC, além do controle negativo, contendo água. A cada 24h, por 72h, as sementes foram avaliadas em relação ao percentual de germinação e, após 72h de análise, as sementes germinadas tiveram o comprimento das suas radículas mensurados. Além disso, foram analisadas a progressão do ciclo celular, indícios de morte e aberrações cromossômicas. Realizaram-se análises bioquímicas do extrato liofilizado e das sementes de alface no período 72h (enzimas SOD, POD, PPO e CAT). Após as primeiras 24h houve queda na taxa de germinação, sendo que, no período 72h, quase todos os tratamentos igualaram-se ao controle, exceto o tratamento 100% que manteve menor taxa em relação ao controle. A análise do comprimento radicular indicou que, após 72h, este foi menor que o controle em todos os tratamentos e que todas as concentrações dos extratos de *M. caesalpinifolia* induziram a diminuição do índice mitótico nos meristemas radiculares de *L. sativa*, além de aumentar o índice de alterações cromossômicas nos meristemas radiculares. A taxa de micronúcleos apresentou diferença em relação ao controle apenas na concentração de 100% à 72h de exposição, enquanto que a taxa de morte celular teve um crescimento com o aumento das concentrações dos extratos, havendo diferença nas concentrações de 50% a 100%. Extratos entre 50% -100% induziram um maior índice de mortes celulares. A presença de precipitado esbranquiçado indicou a complexação tanino-gelatina nas amostras e, conseqüentemente, presença de taninos condensados. Não houve diferença estatística entre os teores de fenóis encontrados. Na avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, os resultados não demonstraram diferença estatística. Não houve diferença significativa para superoxidase dismutase. Para polifenol oxidase, houve diferença entre o controle e os demais tratamentos que não tiveram diferença entre si. Para catalase, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com 25%, mas houve diferença entre o controle e o tratamento com 25% em relação aos tratamentos 50%, 75% e 100% que não tiveram diferença entre si. Na atividade enzimática da peroxidase, houve diferença significativa entre o grupo controle, o tratamento 25% e 50% e os tratamentos 50%, 75% e 100%. Assim, conclui-se que o extrato aquoso de *Mimosa caesalpinifolia* possui atividade fitogenotóxica sobre as sementes de alface e retardando a germinação e comprometendo o desenvolvimento radicular, causando danos ao DNA que podem levar a morte das células.

Palavras-chaves: Alelopatia. Alterações cromossômicas. Sanção-do-campo. Citometria de fluxo. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Allelopathy is a natural phenomenon that involves the release of chemical compounds that may have an inhibitory or stimulating action on other organisms. The species *Mimosa caesalpinifolia* Benth is considered invasive and with allelopathic potential, so this work aimed to carry out a study on the action of the aqueous extract of this species, at different concentrations, on germination and cell cycle of the plant biomodel *Lactuca sativa*. From the crude extract, which used 300g of fresh leaves of *M. caesalpinifolia* in one liter of distilled water, concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% were prepared. For each treatment there were three Petri dishes with 100 lettuce seeds that were protected in DIC, in addition to the negative control, containing water. Every 24 hours, for 72 hours, the seeds were evaluated in relation to the percentage of germination and, after 72 hours of analysis, the germinated seeds had the length of their rootlets measured. In addition, cell cycle progression, manifestations of death and chromosomal aberrations were monitored. Biochemical analyzes of the lyophilized extract and lettuce seeds were carried out in the 72h period (SOD, POD, PPO and CAT enzymes). After the first 24 hours, there was a decrease in the germination rate, and, in the 72-hour period, almost all treatments were equal to the control, except for the 100% treatment, which maintained a lower rate in relation to the control. An analysis of the root length indicated that, after 72h, it was smaller than the control in all treatments and that all concentrations of *M. caesalpinifolia* extracts induced a decrease in the mitotic index in the root meristems of *L. sativa*, in addition to increasing the index of chromosomal alterations in root meristems. The rate of micronuclei showed a difference in relation to the control only in the concentration of 100% at 72h of exposure, while the rate of cell death increased with the increase in the concentrations of the extracts, with a difference in the concentrations of 50% to 100%. Extracts between 50% -100% induced a higher rate of cell death. The presence of a whitish precipitate indicated tannin-gelatin complexation in the sample and, consequently, the presence of condensed tannins. There was no statistical difference between the phenol contents found. In the evaluation of the antioxidant activity by the reduction of the DPPH radical, the results did not show statistical difference. There was no significant difference for superoxidase dismutase. For polyphenol oxidation, there was no difference between the control and the other treatments that there was no difference between them. For catalase, there was no significant difference between the control group and the 25% treatment, but there was a difference between the control and the 25% treatment in relation to the 50%, 75% and 100% treatments, which had no difference between them. In the enzymatic activity of peroxidase, there was a significant difference between the control group, the 25% and 50% treatment and the 50%, 75% and 100% treatments. Thus, it is concluded that the aqueous extract of *Mimosa caesalpinifolia* has phyto-genotoxic activity on lettuce seeds, delaying germination and compromising root development, causing DNA damage that can lead to cell death.

Keywords: Allelopathy. Chromosomal changes. Field sanction. Flow cytometry. High Performance Liquid Chromatography..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Taxa de germinação de sementes de *L. sativa* expostas ao extrato aquoso bruto de *Mimosa caesalpiniiifolia* nas concentrações de 0; 25%; 50%; 75% e 100% nos períodos exposição de: 24h (A), 48h (B) e 72h (C)31
- Figura 2.** Comprimento radicular de *L. sativa* expostas à diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de *M. caesalpiniiifolia* após 72h de exposição32
- Figura 3.** Desenvolvimento radicular de sementes de *L. sativa* expostas à diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de *M. caesalpiniiifolia* após 72h de exposição32
- Figura 4.** (a) metáfase normal; (b) metáfase *stickness*; (c) anáfase normal; (d-g) anáfase com várias pontes cromossômicas; (h) anáfase com fragmentos cromossômicos; (i) metáfase com fragmento cromossômico; (j-k) telófases com ponte; (l) micronúcleo. Barra= 10 μm 34
- Figura 5.** Núcleos heteropicnóticos indicando morte celular (a); Campo visual indicando células com fragmentação do DNA (verde), como um indicativo de morte celular (b); Detalhes de células com ausência de danos, danos leves e danos severos ao DNA pelo teste de Tunel. Barra = 20 μm 36
- Figura 6.** Histogramas mostrando o incremento de célula/eventos na fase sub G1(verde escuro)37
- Figura 7.** Amostras com precipitação indicando presença de taninos38
- Figura 8.** Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de *M. caesalpiniiifolia* (concentração 25%, 50%, 75% e 100%) por CLAE-UV40
- Figura 9.** Espectros de flavonoides encontrados nas amostras40
- Figura 10.** Médias dos conteúdos de proteínas totais (A – mg g^{-1} MF), (B), catalase (CAT, $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} / \text{mg}^{-1}$ proteína), (C), peroxidase (POD, $\mu\text{mol mg}^{-1}$ prot) (D), polifenol oxidase (PPO; $\mu\text{mol mg}^{-1}$ prot) (E), superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD mg^{-1} proteína) em sementes de *L. sativa* germinadas em placa de Petri, por 72 horas, contendo extrato aquoso de *M. caesalpiniiifolia* em quatro concentrações

distintas (25%, 50%, 75% e 100%) e o controle contendo água destilada. Colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; n = 15. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^(a-c).....**41**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas nas análises em CLAE para os extratos de <i>M. caesalpinifolia</i>	28
Tabela 2. Índice mitótico observado nos meristemas radiculares de <i>L. sativa</i> à 72h de exposição aos extratos de <i>M. caesalpinifolia</i>	34
Tabela 3. Valor médio de aberrações cromossômicas observados meristemas radiculares de <i>L sativa</i> expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>M caesalpinifolia</i> por 72h	34
Tabela 4. Taxa de micronúcleos e núcleos mortos observados em meristemas radiculares de <i>L sativa</i> expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>M caesalpinifolia</i> por 72h	35
Tabela 5. Classificação de núcleos apresentando ausência de danos, danos leves e danos severos ao DNA por meio do teste de TUNEL	36
Tabela 6. Teores de fenóis nos extratos liofilizados de <i>M. caesalpinifolia</i>	38
Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Aberração Cromossômica

CAT – CATALASE

cm – CENTIMETRO

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

ERO's – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

g – GRAMA

H₂O₂ – PEROXIDO DE HIDROGÊNIO

IM – ÍNDICE MITÓTICO

mg - MILIGRAMA

ml - MILILITRO

MM – MILIMOLAR

mm – MILÍMETRO

MN – MICRONÚCLEO

nm – NANOMETRO

O₂⁻ – ÂNION SUPERÓXIDO

OH – RADICAL HIDROXILA

POD – PEROXIDASE

PPO – POLIFENOL OXIDASE

RNA – ÁCIDO RIBONUCLEICO

rpm – ROTAÇÃO POR MINUTO

SOD – SUPEROXIDO DISMUTASE

v/v – VOLUME/ VOLUME

µL – MICROLITRO

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Revisão Bibliográfica	14
2.1 Alelopatia	14
2.2 <i>Mimosa Caesalpinifolia</i> Benth.	16
2.3 Potencial alelopático de <i>Mimosa Caesalpinifolia</i> Benth	16
2.4 Citogenotoxicidade e alelopatia	18
2.5 Biomodelos usados no estudo de alelopatia	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	22
4 METODOLOGIA	22
4.1 Material vegetal	22
4.2 Preparação do extrato aquoso bruto de <i>Mimosa Caesalpinifolia</i>	22
4.3 Teste de fitotoxicidade	23
4.4 Citometria de fluxo	23
4.5 Análise do ciclo celular e aberrações cromossômicas	24
4.6 Teste de Tunel	24
4.7 Análises bioquímicas	25
4.7.1 Caracterização bioquímicas do extrato liofilizado de <i>M. Caesalpinifolia</i>	25
4.7.2 Análises das atividades enzimáticas da catalase (CAT), superoxidase desmutase (SOD), peroxidase (POD) e polifenol (PPO) das sementes de <i>L. sativa</i>	28
4.8 Análise de dados	30
5 RESULTADOS	30
5.1 Teste de fitotoxicidade	30
5.2 Análise do ciclo celular, aberrações cromossômicas, taxa de micronúcleo e índice de morte celular.....	32
5.3 Teste de Tunel e Citometria de fluxo	35
5.4 Testes fitoquímicos e de estresse enzimático	37
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

A alelopatia consiste em um fenômeno natural que envolve efeitos diretos ou indiretos de plantas ou microrganismos pela liberação de compostos químicos que podem ter ação inibidora ou estimuladora em outros organismos, causando-lhes respostas fisiológicas, celulares, moleculares, afetando a germinação de plantas ou, até mesmo, inibindo a divisão celular, por exemplo. Além disso, alguns desses compostos podem ser isolados e utilizados para a produção de fármacos como antimetabólitos, herbicidas entre outros. É um reconhecido mecanismo ecológico responsável por influenciar a vegetação existente em um ecossistema, a sobrevivência e o estabelecimento de algumas espécies em um determinado local. (OLIVEIRA et al, 2011; GLAB et al, 2017).

A *Mimosa caesalpinifolia* (Fabaceae) possui múltiplas aplicações que vão desde a formação de cercas-vivas à utilização na medicina popular como anti-inflamatório para doenças crônicas. Além disso, é considerada espécie invasora e com potencial alelopático. Por ser uma planta tolerante à luz direta e de rápido crescimento, vem sendo muito utilizada no reflorestamento de áreas degradadas, formando ilhas desses indivíduos ao inibir o desenvolvimento de outras espécies. (PIÑA-RODRIGUES & LOPES, 2001; PINTO, 2016; TEIXEIRA et al, 2017).

Embora o potencial alelopático de *M. caesalpiniaefolia* seja reconhecido, poucos estudos acerca do assunto foram realizados até o momento, sendo o objetivo do presente trabalho avaliar o potencial citogenotóxico da espécie e sua ação sobre a germinação e desenvolvimento radicular do biomodelo vegetal *Lactuca sativa* L.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALELOPATIA

A etimologia da palavra alelopatia é composta pelos elementos gregos “*allelon*” que significa “outros” e “*pathos*” que significa “sofrer”. Consiste em um fenômeno natural de interferência biológica com efeitos diretos ou indiretos de compostos químicos no ambiente, sendo essa interferência citada na literatura por mais de 2000 anos até ser reconhecida como alelopatia pelo professor austríaco e fisiologista vegetal, Hans Molish em 1937. Em 1996, a Sociedade de Alelopatia

definiu-a como qualquer processo que envolva metabólitos secundários que sejam produzidos por plantas, fungos, microrganismos ou vírus e que influenciem no desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícola (GLAB *et al.*, 2017; SODAEIZADEH & HOSSEINI, 2012).

A alelopatia é um mecanismo químico que auxilia as plantas dando-lhes vantagens sob a competição de recursos, sendo que a habilidade de uma planta em suprimir outra depende tanto da alelopatia inerente à espécie quanto da própria competitividade. A alelopatia requer a introdução de substâncias químicas no ambiente enquanto a competitividade retira recursos de determinado ambiente, sendo que quando os dois fenômenos ocorrem ao mesmo tempo, caracteriza-se a interferência. Os aleloquímicos são metabólitos secundários não nutricionais que interagem com plantas que estão ao redor afetando funções fisiológicas e, ainda, comprometendo a germinação ou o crescimento das mesmas, tanto inibindo quanto estimulando, além de ser usados como herbicidas naturais em substituição aos sintéticos (BACHHETI *et al.*, 2019; CHENG & CHENG, 2015; PIRES & OLIVEIRA, 2011).

São constituídos por diferentes compostos como, por exemplo: terpenos, benzoquinonas, flavonoides, estrigolactonas, aminoácidos não proteicos, ácidos fenólicos e graxos e são classificados de acordo com suas estruturas e propriedades, sendo que alguns precisam ser modificados por microrganismo ou pelas condições ambientais, mas, geralmente, penetram no solo como compostos já ativos para as plantas. Por exemplo, o crescimento e o desenvolvimento de raízes podem ser afetados por aleloquímicos que causam mudanças na síntese de DNA das células do meristema apical, no metabolismo mitocondrial ou ainda na estrutura e dinâmica dos cromossomos nas células mitóticas. Plantas, grãos de pólen e sementes, são exemplos de biomodelos utilizados em pesquisas envolvendo alelopatia (ROSHCHINA, 2004; GATTI, 2010; SOLTYS *et al.*, 2013).

Quase todas as partes e tecidos das plantas podem produzir ou armazenar aleloquímicos. Tais substâncias podem ser liberadas, de várias formas, como pela volatilização, exsudação de raízes ou da decomposição de resíduos e lixiviação foliar e serapilheira. De maneira geral, o estudo da alelopatia é focado, principalmente, na relação entre culturas vegetais e plantas invasoras, na busca por alternativas aos herbicidas, mas também é aplicável no controle de insetos e doenças, melhorias na

qualidade do solo, entre outros pontos (GLAB *et al.*, 2017; POLYAK & SUKCHAREVICH, 2019).

2.2 *Mimosa Caesalpinifolia* BENTH (Fabaceae)

Mimosa caesalpinifolia, conhecida popularmente como “sabiá”, “sansão-do-campo”, “angiquinho-sabiá” ou “unha-de-gato”, é uma espécie de leguminosa pertencente à subfamília Mimosaceae que compreende cerca de 4000 espécies distribuídas em 60 gêneros em regiões subtropicais e tropicais. É uma árvore de pequeno porte, nativa da Caatinga e do Cerrado brasileiro, encontrada principalmente no Nordeste do Brasil que apresenta alta capacidade de adaptação, de tolerância a solos ácidos e de regeneração do solo. Possui como características principais flores com cores branco-creme, ritidoma marrom-escamoso, semicaducifolia, folhas recompostas, ramos espinhosos, inflorescência em espiga, podendo alcançar altura entre quatro a dez metros (MONÇÃO *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2020).

A espécie *M. caesalpinifolia* Benth possui uma gama de utilidades: as cascas podem ser utilizadas no tratamento de bronquite e ferimentos; as flores para o tratamento da hipertensão e de inflamações; a madeira é comumente utilizada como sebe e carvão vegetal; as folhas como forrageamento para alimentação de animais em período de seca e, ainda, pode ser usada para reflorestamento de áreas degradadas. Devido à sua adaptação, crescimento rápido e presença de espinho, vem sendo utilizada no paisagismo para formação de cercas vivas nas Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (ARAÚJO e PAES, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2020).

Mesmo nativa do semiárido, a espécie possui boa adaptação a outros biomas do país devido a sua baixa exigência quanto à fertilidade do solo e a umidade, sendo catalogada no Cerrado, na Caatinga, na Amazônia e na Mata Atlântica e registrada em vinte e um estados do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2019; XAVIER *et al.*, 2020).

2.3 Potencial alelopático de *Mimosa Caesalpinifolia* Benth.

Quando pensamos nas causas que provocam a perda de biodiversidade global, temos como um dos problemas potenciais as espécies exóticas invasoras que

podem ser introduzidas em uma determinada área acidentalmente ou intencionalmente, disseminando-se e causando impactos ambientais naquela região. Basicamente, espécies invasoras são aquelas capazes de se reproduzir, manter sua população com independência e com capacidade de dispersão na nova região onde se encontra, não necessariamente sendo agressiva com outras espécies nativas do local (FERREIRA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

O potencial invasor de uma espécie pode ser explicado através da liberação de compostos alelopáticos, pois espécies nativas, em geral, não conseguem desenvolver-se em conjunto à outras invasoras, sendo afetadas negativamente pelos compostos alelopáticos liberados, o que pode comprometer a estrutura da comunidade nativa, bem como a diversidade, a abundância e a dinâmica das mesmas (ORR *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2017).

Por ser uma espécie tolerante a luz direta e com capacidade de rápido crescimento, bifurcação e rebrota, muitos estudos concordam com a hipótese de seu efeito alelopático sobre outras espécies, ao prejudicar o estabelecimento e a eficiência no reflorestamento (PIÑA-RODRIGUES e LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2010). Além disso, a espécie é possuir altas concentrações de fenóis, substâncias essas associadas à ação alelopática da planta, que podem ser liberados no ambiente por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e decomposição, prejudicando a germinação de espécies nativas (ANDRADE *et al.*, 2017).

O extrato bruto de *M. caesalpinifolia*, confere a planta propriedades antimicrobiana como observado no estudo realizado por Callou e seus colaboradores (2012), que constatou a presença de taninos, alcaloides, esteroides e terpenos em sua casca, confirmando assim o potencial terapêutico da planta contra os microrganismos: *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e *Candida albicans* (levedura). Já no estudo realizado por Teixeira (2013), a serrapilheira do sabiá interferiu negativamente na velocidade de crescimento de *M. bimucronata*.

2.4 Citogenotoxicidade e Estresse Vegetal

Todos os elementos que são tóxicos às células, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, que impedem o desenvolvimento ou levam à morte, são chamados de agentes citotóxicos. Para considerar a citotoxicidade de substâncias, deve-se avaliar o aparecimento de alterações que ocorram na divisão celular pela inibição do índice mitótico ou alterações na estrutura e morfologia das células (SOUZA *et al.*, 2005; ÇELIK, 2018; ISTIFLI e ILA, 2019). Pode-se determinar a citotoxicidade, por exemplo, examinando as células pelo microscópio, determinando se o efeito é atóxico, leve, moderado ou severo através da avaliação das mudanças na morfologia, vacuolização, lise celular ou de membrana ou pela quantificação da morte celular (ROGEROA *et al.*, 2003).

Já a genotoxicidade é definida como a capacidade de algumas substâncias em induzir alterações no material genético de organismos causando-lhes danos no DNA, aberrações cromossômicas e mutações. A atividade genotóxica pode ser determinada através de ensaios como, por exemplo, quantificação de alterações cromossômicas, teste de micronúcleos e o ensaio Túnel (DAMASIO, 2016).

Um importante aliado na determinação da genotoxicidade é a citometria de fluxo que fundamenta-se em analisar a dispersão da luz ou fluorescência emitida por partículas que são submetidas à um sistema de fluxo por fluídos em que os sinais eletrônicos gerados são convertidos em sinais digitais que demonstram esses resultados a partir de histogramas, gráficos ou *dotplots*, sendo que as partículas, em questão, são analisadas individualmente e em alta velocidade. Basicamente, baseia-se no corte do matéria vegetal que tem seus núcleos isolados por uma solução tampão que são filtrados e, posteriormente, corados com um fluorocromo intercalante ao material do DNA. No citômetro, são gerados os histogramas baseados na quantificação dos núcleos corados que emitem fluorescência na amostra (DOLEŽEL, 1997; LOUREIRO e SANTOS, 2004; PELLICER E LEITCH, 2014; COSTA, 2018).

Adaptando as técnicas de citometria de fluxo para aplicação em células vegetais é possível otimizar as análises do conteúdo de DNA, atividade mitótica, seleção de cromossomos, entre outras, tornando-se uma alternativa para determinação de conteúdo de DNA devido à sua precisão, facilidade e velocidade (NOIROT *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2017).

De forma geral, a citogenotoxicidade pode ser desencadeada por diversos estressores que causam danos celulares e genéticos, podendo citar a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HAQ *et al*, 2018; HAQ & KALAMDHAD, 2021). O estresse causado por aleloquímicos leva a mudança do papel regulador EROs na sinalização celular em vista da sua toxicidade que podem estar relacionadas as alterações do desequilíbrio entre a produção e a eliminação dos mesmos (ZERLIN, 2015).

O estresse vegetal tem início quando ocorre, imprevisivelmente, variação ou restrição de fatores abióticos ou bióticos que causam prejuízos à determinadas funções e que, como consequência, perturbam a homeostase fisiológica da planta. O estresse ambiental abiótico é aquele causado por fatores edafoclimáticos, ou seja, relacionados ao clima e ao solo, como por exemplo altas ou baixas temperaturas, déficit hídrico ou deficiência de nutrientes. Já o estresse ambiental biótico é aquele causado por outros organismos, tais como as plantas (competição por recursos e alelopatia), microrganismos (fungos, vírus e bactérias), animais (herbivoria ou pisoteio) e ação humana (poluição, fogo, compactação do solo, entre outros) (LARCHER, 2000; LARCHER, 2006).

Ao sofrerem estresse, muitos organismos aeróbicos, como as plantas, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que em excesso causam danos as proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MATSUO *et al*, 2015). Alguns mecanismos enzimáticos são uma das ferramentas envolvidas para a detoxificação das espécies reativas de oxigênio que, juntamente com os mecanismos não enzimáticos, causam a explosão oxidativa que é uma resposta de defesa da planta devido à geração de espécies reativas de oxigênio (RESENDE *et al*, 2003). São exemplos dessas enzimas, as superóxidos desmutases (SODs) que desmutam radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio; as catalases (CATs) que convertem H_2O_2 oriundo da fotorrespiração em H_2O e O_2 ; as peroxidases que estão envolvidas na proteção, cicatrização, lignificação entre outras funções (HSU & KAO, 2003; CALVANCANTI *et al*, 2007; MATSUO *et al*, 2015).

Além disso, as plantas produzem diferentes produtos químicos classificados como metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários são aqueles envolvidos diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas como,

por exemplo, açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, lipídeos e moléculas maiores sintetizadas a partir desses como o RNA e DNA (GARCIA & CARRIL, 2009). Já os metabólitos secundários, são responsáveis pela evolução e interação entre as plantas e outros seres vivos. Esses compostos são sintetizados e segregados nos tricomas e, geralmente, pertencem a uma das três classes principais de moléculas, sendo essas os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados que, em suma, estão relacionados na proteção das plantas contra os estresse abiótico e biótico (CHAMPAGNE & BOUTRY, 2016; TENENBOIM & BROTMAN, 2016).

2.5 Biomodelos usados no estudo de alelopatia

A citogenética é amplamente utilizada em análises de monitoramento de compostos tóxicos por apresentar baixo custo, fácil manuseio e boa correlação em combinação com outros testes. Os agentes genotóxicos são aqueles capazes de afetar, de forma negativa, o material genético de células e, assim, causar alterações em sua estrutura ou função que podem induzir mutações (DRAGOEVA *et al.*, 2015; MORSI & ABDELMIGID, 2016; TERCEIRO & OLIVEIRA, 2020).

No decorrer do reconhecimento da alelopatia como ciência, foram desenvolvidos procedimentos experimentais para a identificação dos compostos químicos nas plantas, inclusive aqueles relacionados à atividade alelopática (NARWAL, 1996; FERREIRA & AQUILA, 2000; PIRES & OLIVEIRA, 2011). Dentre os biomodelos vegetais de maior ocorrência no estudo da alelopatia, pode-se destacar as espécies *Allium cepa* L. (cebola), *Solanum lycopersicum* L. (tomate) e *Lactuca sativa* L. (alface), devido à alta sensibilidade que apresentam às mais diversas concentrações de aleloquímicos, além da rápida germinação e tolerância às variações de pH; adicionalmente são de baixo custo e não necessitam da aprovação de comitês de ética. Além do teste com *A. cepa*, o teste utilizando *L. sativa* também é amplamente aplicado para avaliar o efeito tóxico que ocorre sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. Entretanto, muitos trabalhos também tem utilizado esta espécie para análises de citogenotoxicidade (FERREIRA & AQUILA, 2000; SILVEIRA, 2016).

A *Lactuca sativa* L. é considerada uma espécie bioindicadora de fitotoxicidade e citogenotoxicidade de um composto ou de um conjunto de compostos como, por exemplo, estudos de interações alelopáticas, efluentes domésticos e

industriais, lixiviado de aterros sanitários, resíduos da construção civil, água e sedimentos contaminados. Além disso, oferece vantagens sobre outros organismos-teste pelo seu baixo custo, fácil cultivo e baixa manutenção durante os bioensaios em que são avaliados a inibição da germinação e o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo. As etapas de germinação e desenvolvimento das plântulas são tão sensíveis que até a mínima concentração de um contaminante pode retardar o seu desenvolvimento (SOARES, 2015; SILVEIRA, 2016; LELES, 2017; GRZYCZAK *et al.*, 2018).

Aragão *et al.* (2017), por exemplo, utilizaram diferentes extratos de *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) para investigar o mecanismo de ação sob a germinação, o desenvolvimento de mudas e do meristema apical da raiz celular de *L. sativa*. Como resultado, houve diminuição na velocidade de germinação e do tamanho da raiz, mostrando a eficiência do biomodelo. Já no trabalho realizado por Vieira *et al* (2018), os autores utilizaram o biomodelo *L. sativa* para avaliar o efeito tóxico do óleo extraído das sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) sobre as células meristemáticas. Como resultados foram observados efeitos citotóxicos e fitotóxicos sobre o biomodelo, o que é útil na identificação de variedades tóxicas e não tóxicas do óleo de pinhão-manso. No trabalho realizado por Swiech e seus colaboradores (2021), as sementes de *L. sativa* foram utilizadas para avaliar a ação alelopática dos extratos cetônicos e etanólicos do caule e da folha de *Philodendron meridionale*, confirmada pelo efeito negativo sobre a germinação, o crescimento, a respiração e as atividades enzimáticas sobre esse biomodelo, sugerindo relação desse efeito com a permeabilidade da membrana e estresse oxidativo sofridos pelas semente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a ação do extrato aquoso bruto da espécie *Mimosa caesalpinifolia*, em diferentes concentrações, sobre a germinação e o ciclo celular do biomodelo vegetal *Lactuca sativa*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e correlacionar possíveis alterações cromossômicas com o desenvolvimento de plantas na germinação de sementes de alface tratadas com o extrato de *M. caesalpinifolia*
- Averiguar qual a concentração do extrato de *M. Caesalpinifolia*, sendo elas 25%, 50%, 75% e 100%, é mais citogenotóxica
- Validar o caráter alelopático de *M. caesalpinifolia*
- Identificar a presença de compostos fenólicos e realizar análise da atividade enzimática nas sementes embebidas com extrato das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e polifenol oxidase.

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

Folhas frescas de *Mimosa caesalpinifolia* foram coletadas no período da manhã em uma população encontrada no bairro São Pedro na cidade de Juiz de Fora/ MG (latitude: 21° 46' 19" Sul; Longitude: 43° 23' 13" Oeste). A coleta foi realizada em Junho de 2021. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel, levadas até o Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora a fim de utilizá-las no preparo do extrato aquoso bruto.

4.2 Preparação do extrato aquoso bruto de *Mimosa Caesalpinifolia*

Para o preparo do extrato aquoso das folhas de *M caesalpinifolia* foi utilizada a metodologia descrita por Çelik e Alansturk (2007) com algumas modificações. Folhas frescas foram pesadas e o extrato aquoso bruto foi preparado utilizando-se 300g de folhas em 1L de água destilada. As folhas foram rasgadas à mão e mergulhadas em água destilada em um béquer de vidro coberto com papel alumínio. Após 24h de extração, à temperatura ambiente (21°C), os pedaços de folhas foram desprezados, utilizando-se o auxílio de uma peneira de metal, e a solução aquosa coletada, filtrada em papel de filtro. Após o processo de filtragem, a solução

obtida foi imediatamente utilizada para preparar as diluições com acréscimo de água destilada em quatro diferentes concentrações estabelecidas para o experimento: 100%; 75%; 50% e 25%.

4.3 Teste de fitotoxicidade

Para a avaliação da fitotoxicidade das diferentes concentrações do extrato aquoso obtido, sementes de alface, variedade Santa Mônica, obtidas comercialmente, foram utilizadas e distribuídas em placas de Petri de vidro (15x150 mm), forradas com papel de filtro umedecido com 6ml das diferentes concentrações descritas anteriormente. O delineamento experimental utilizado foi o DIC (inteiramente casualizado), estabelecendo-se triplicatas de cada tratamento, sendo que cada placa de Petri continha 100 sementes de alface. Como controle negativo, sementes de alface foram germinadas em placas de Petri contendo água destilada. O experimento foi mantido em temperatura ambiente (21°C) na ausência de luz. A cada 24h, durante um período de 72h, as sementes foram avaliadas em relação ao percentual de germinação e após 72h de análise as sementes germinadas tiveram o comprimento das suas radículas mensurados (30 raízes por repetição, 90 por tratamento) com o auxílio de um paquímetro digital.

4.4 Citometria de fluxo

Com a finalidade de se analisar a progressão do ciclo celular e indícios de morte celular, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Após 72h do início do experimento, 5 raízes de cada replicata, sendo 15 raízes por tratamento, foram coletadas e avaliadas em citometria de fluxo. Com o auxílio de uma lâmina, os meristemas foram seccionados em uma placa de Petri contendo 400 µL de solução tampão WPB (LOUREIRO *et al*, 2007). Utilizando uma rede nylon de 30 µm, as soluções nucleares foram filtradas após o isolamento dos núcleos para máxima retirada de resíduos, sendo posteriormente corada com 25 µL de iodeto de propídeo (1mg/mL). As suspensões obtidas foram avaliadas em citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter, Alemanha) e os dados gerados analisados com o software CytExpert 2.0.

4.5 Análise do ciclo celular e aberrações cromossômicas

Após 72h do início de avaliação, raízes de alface, para cada replicata do experimento, foram fixadas em Carnoy I (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) e mantidas em freezer a -20°C. Para o preparo das lâminas, as radículas fixadas foram lavadas em água destilada e a região meristemática isolada e, posteriormente, digerida em solução enzimática [20% de pectinase (Sigma) e 2% de celulase (Serva-Onozuka R-10)] a 37°C por um período de 3h. A técnica de esmagamento descrita por Guerra & Souza (2002) foi utilizada para a confecção das lâminas que foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, 0,4% w/v em Metanol) 5% (v/v). Todas as lâminas produzidas foram observadas em microscópio de luz (Olympus BX41). Após a finalização da análise das lâminas, para obtenção do índice mitótico (IM), do índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleo (MN), foram contabilizadas, aproximadamente, 5000 células por repetição (15.000 por tratamento). Para tal finalidade, foram utilizadas as equações descritas abaixo:

Índice Mitótico (IM)

$$= n^{\circ} \text{ de células em divisão} \div n^{\circ} \text{ total de células analisadas} \times 100$$

Aberrações Cromossômicas (AC)

$$= n^{\circ} \text{ de cél. com AC} \div n^{\circ} \text{ total de cél. em divisão} \times 100$$

Taxa de Micronúcleos (MN)

$$= n^{\circ} \text{ de células com micronúcleos} \div n^{\circ} \text{ total de cél. analisadas} \times 100$$

Taxa de Morte Celulas (MC)

$$= n^{\circ} \text{ de células mortas} \div n^{\circ} \text{ total de cél. analisadas} \times 100$$

4.6 Teste de TUNEL

Para complementar as análises de citogenotoxicidade, foi realizado o teste de morte celular pelo kit Deadend™ Fluorometric Kit do sistema TUNEL (Promega®). Para isso, 3 raízes de cada placa, totalizando 12 raízes para cada concentração de extrato e o controle negativo (água) foram utilizadas para análise, ou seja, no total 60 lâminas foram utilizadas no teste.

Após 72 h de exposição aos extrato, raízes foram coletadas e lavadas em água destilada. Em seguida, as mesmas foram secas e digeridas por 15 minutos a 37°C em solução enzimática [20% de pectinase (Sigma) e 2% de celulase (Serva-Onozuka R-10)]. As lâminas foram preparadas com o método de esmagamento e as lamínulas removidas pelo congelamento em nitrogênio líquido. Após o preparo, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% e submetidas aos procedimentos descritos pelo fabricante do Kit utilizado. Para a análise, as lâminas receberam 20 µL de Vectashield® com 1 µg mL⁻¹ de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Em seguida, as mesmas foram cobertas com lamínulas, seladas com esmalte incolor e analisadas em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 51) em um comprimento de onda de 488-495 nm para fluoresceína e de 345 a 358 nm para DAPI. Os núcleos foram analisados em ambos comprimentos de ondas, as imagens capturadas e sobrepostas, permitindo a detecção de danos nos núcleos através da emissão de fluorescência verde. De acordo com a coloração observada no microscópio de fluorescência, os núcleos foram classificados como: sem danos (ausência de fluorescência verde), contendo danos leves (núcleos com porções azuis e verdes) e contendo danos severos (núcleos completamente verdes). Foram analisados 500 núcleos por lâmina, três lâminas por tratamento.

4.7 Análises bioquímicas

4.7.1 Caracterização bioquímicas do extrato liofilizado de *M. Caesalpinifolia*

Identificação de Taninos:

A identificação de taninos nos extratos de *M. caesalpinifolia* foi determinado pelo método disponível no site da Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2009) com algumas modificações. Para a realização do experimento, 35 ml de cada extrato foram liofilizados (Liofilizador Alpha 1-2 LD Plus – Christ). Posteriormente, foram pesadas 10 mg de extrato liofilizado de cada tratamento/concentração que, em sequência, foram diluídos em 1 ml de água destilada e solubilizados com ajuda de aparelho vórtex (uma solução aquosa de gelatina a 2,5% foi preparada pesando-se 0,25g de gelatina incolor comercial em 10 ml de água destilada que subsequentemente foi homogeneizada em manta

aquecedora até total solubilização. Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução de gelatina à solução aquosa do extrato liofilizado dos quatro tratamento/concentrações e, em seguida, estes foram centrifugados por 5 minutos.

Determinação do conteúdo de fenóis pelo método de Folin e Ciocalteu:

O conteúdo de fenóis nas amostras foi determinado pelo método de Folin e Ciocalteu (1927), com algumas modificações. Foram adicionados em microplacas de 96 poços, 120 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (20% v/v em água destilada), 30 µL das amostras [1 mg/mL em etanol e água (95:5 v/v)] e 100 µL de solução carbonato de sódio (4% m/v em água destilada). Poços com os mesmos volumes dos reagentes e etanol foram preparados como branco do teste e uma curva analítica do padrão ácido tânico foi obtida nas mesmas condições das amostras, com concentrações de 0,9 a 60 µL/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Após 30 minutos em repouso e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em leitor automático de microplacas (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) a 750 nm. Os resultados foram expressos em mg/g de amostra em equivalente ao ácido tânico (EAT) ± desvio padrão, utilizando regressão linear no Excel.

Determinação da atividade antioxidante pelo ensaio de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH):

Já a determinação da atividade antioxidante das amostras foi realizada pelo ensaio de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de acordo com a metodologia proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Para a realização do ensaio, as amostras foram solubilizadas em etanol e água (95:5 v/v) para a obtenção de uma solução estoque a 2 mg/mL. Alíquotas de 100 µL de cada solução foram transferidas para uma microplaca de 96 poços. Foi preparado um branco do teste com todos os reagentes, excetuando-se as amostras que foram substituídas por etanol. A quercetina foi utilizada como substância de referência, nas mesmas condições das amostras. Foram preparadas dez soluções nas concentrações de 0,97 a 500 µg/mL, em que esses valores sobem de dobro em dobro até chegar a

500 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução de DPPH (20 µg/mL em etanol) em todos os poços. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 517 nm em leitor automático de microplacas (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). O procedimento foi realizado em triplicata e por meio dos valores encontrados, foi possível o cálculo do percentual de inibição dos extratos de acordo com a Equação:

$$\% \text{ de inibição de amostras} = (Ab - Aa) \times 100.$$

Em que:

- Ab: absorvância do branco do teste.
- Aa: absorvância das amostras.

Identificação de constituintes químicos pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

Para a identificação dos constituintes químicos, os extratos liofilizados de *Mimosa caesalpinifolia* Benth foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) realizada no equipamento Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Santa Clara, Califórnia, EUA) no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora. O equipamento é constituído por bomba quaternária, detector de arranjos de diodo-ultravioleta (DAD-UV) e injetor automático, além de uma coluna de fase reserva Kromasil C18 (Kromasil®, Bohus, Suécia) que possui cerca de 4,6 mm de largura e 150 mm de comprimento. O espectro ultravioleta (UV) foi determinado entre 190 a 400 nm, sendo o comprimento de 350 nm o utilizado na detecção. Os extratos foram preparados a 10 mg/mL e solubilizados em acetonitrila e água (05:95 v/v). As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas nas análises em CLAE para os extratos de *M. caesalpinifolia*

Volume de Injeção (µL)	Fluxo (mL/min.)	Tempo de Eluição (min.)	SOLVENTES	
			Acetonitrila	Água
20	0,800	0,00	5	95
		5,00	15	85
		35,00	60	40

Fonte: elaborada pela autora

4.7.2 Análises das atividades enzimáticas da catalase (cat), superoxidase desmutase (sod), peroxidase (pod) e polifenol oxidase (ppo) das sementes de *L. Sativa*

Para a realização das análises de atividade enzimática foram utilizadas as mesmas diretrizes do teste de fitotoxicidade, obtendo, assim, três placas por tratamento, totalizando quinze placas (quatro tratamento mais o controle negativo). Para cada placa colocou-se aproximadamente 0,01 g de sementes de alface (cerca de 100 sementes) para que os valores iniciais fossem próximos. Após o período de 72 horas de germinação, as placas contendo as sementes de alface germinadas foram levadas ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Juiz de Fora para prosseguir com o experimento.

Os extratos brutos utilizados para determinar os teores de proteínas totais e das atividades enzimáticas, sendo essas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POD) e a polifenol oxidase (PPO), foram obtidos através do processo de maceração das raízes contidas em cada placa. As raízes foram alocadas em almofarizes de porcelana após a retirada do excesso de água/ extrato e maceradas em N₂ em conjunto com 20 mg de Polyvinylpyrrolidone (PVPP), 50 µL de Fluoreto de Fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e 10 ml de solução Tampão Fosfato de Potássio 0,1

M, pH 6,8 (Tampão de Extração) + Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM (Peixoto et al., 1999). O extrato obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g por 20 minutos e a 2°C, sendo esse procedimento realizado duas vezes para purificação do sobrenadante.

Os teores de proteínas totais foram determinados através do método de Lowry et al. (1951) utilizando-se de três reagentes: reagente A [0,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1,0g de citrato de sódio em 100 ml de água]; reagente B (10g de Na_2CO_3 + 2,0g NaOH 0,1 N em 500 ml de água destilada); reagente C (solução resultante da adição de 50 ml do reagente B + 1ml do reagente A) e reagente D constituído de 7,5 ml do reagente Folin-Ciocalteau diluído em 7,5 ml de água destilada. Para cada amostra de extrato enzimático foram preparadas três replicatas, sendo que em cada tubo foram adicionados 100 μL do extrato enzimático bruto acrescidos de 2,5 mL do reagente C, homogeneizados em agitação suave seguidos de 10 minutos de repouso em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 250 μL do reagente D, seguida de agitação em vórtex e repouso de 30 minutos em temperatura ambiente.

Para determinar o teor de proteínas, fez-se necessário determinar a curva de calibração utilizando BSA (albumina de soro bovino) 1 mg/mL^{-1} como padrão. Os resultados encontrados para os teores de proteínas nas amostras foram utilizados para calcular as atividades específicas das enzimas SOD, CAT, POD e PPO.

Para a determinação da atividade da catalase (CAT) nos tecidos de *L. sativa*, utilizou-se a metodologia proposta por Havir e McHale (1987). O meio de reação foi constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C + H_2O_2 12,5 mM do qual foram utilizados 2,9 ml com posterior adição de 100 μL do extrato enzimático bruto. Considerando o decréscimo na absorbância a 240 nm, a atividade enzimática foi determinada pela estimativa do consumo de H_2O_2 utilizando o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para os cálculos como sugerido por Anderson *et al* (1995).

A metodologia utilizada para a determinação de superóxido dismutase (SOD) nos tecidos do material vegetal foi a proposta por Del Longo e seus colaboradores (1993). Para qual, utilizou-se metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 100 nM e riboflavina 2 μM em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, adicionado de 100 μL do extrato enzimático bruto que

constituíam a mistura de reação, posteriormente conduzida em câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W a 25 °C com o interior da caixa coberta com papel alumínio ligada por 5 minutos (GIANNOPOLITIS E RIES, 1977). A resultante da fotorredução do NBT (formazana azul) foi medida, na absorbância a 560 nm, pela determinação do incremento, subtraído do controle, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro, considerando que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP E FRIDOVICH, 1971).

O método de Kar e Mishra (1976) foi utilizado para determinar as atividades da POD e da PPO. Para qual, 100 µL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 4,9 mL de uma mistura de reação composta por tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 + pirogalol 20 mM + H₂O₂ 20 mM (POD) ou água deionizada (PPO). Após o período de incubação da solução por um minuto a 25°C, adicionou-se 200 µL de H₂SO₄ 5% (v/v) a fim de interromper a reação, seguindo a absorbância da solução, então, lida em espectrofotômetro a 420 nm, contra o controle, que teve a enzima previamente inativada pela adição de 200 µL de H₂SO₄ 5% (v/v). Para estimar as atividades da POD e da PPO, determinou-se a quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se, como sugerido por Chance e Maehley (1955), o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ para os cálculos.

4.8 Análise de dados

Para a análise dos testes foi realizada análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos, seguido da comparação de médias por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa estatístico GraphPad Prism 7.04 (2017).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de fitotoxicidade

Por meio do teste de fitotoxicidade foi possível observar que, após 24h de exposição das sementes de *L. sativa* às diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de *M. caesalpinifolia*, as taxas de germinação das sementes de alface apresentaram atraso em relação ao controle (Figura 1A). Na maior concentração

(100%), a taxa de germinação foi muito próxima de zero, enquanto que para o controle quase 100% das sementes germinaram (Figura 1A). Após 48h de exposição, a taxa de germinação das sementes do tratamento à 25% se igualou ao controle, enquanto os tratamentos à 50%, 75% e 100%, apesar de terem um incremento em suas taxas de germinação, ainda se apresentaram diferentes do controle (Figura 1B), mostrando uma taxa de germinação menor. Por outro lado, após 72h de exposição, quase todos os tratamentos igualaram sua taxa de germinação ao controle (Figura 1C), exceto o tratamento com maior concentração (100%), que mesmo após esse tempo apresentou uma taxa de germinação menor quando comparado ao controle (Figura 1C).

Embora as sementes tenham apresentado recuperação da taxa de germinação após 72h de experimentação, a análise do comprimento radicular indicou que o comprimento radicular, em todos os tratamentos, foi menor que o comprimento radicular do controle (Figura 2 e Figura 3). Havendo uma diminuição contínua do desenvolvimento radicular com o aumento das concentrações dos extratos de *M. caesalpinifolia*.

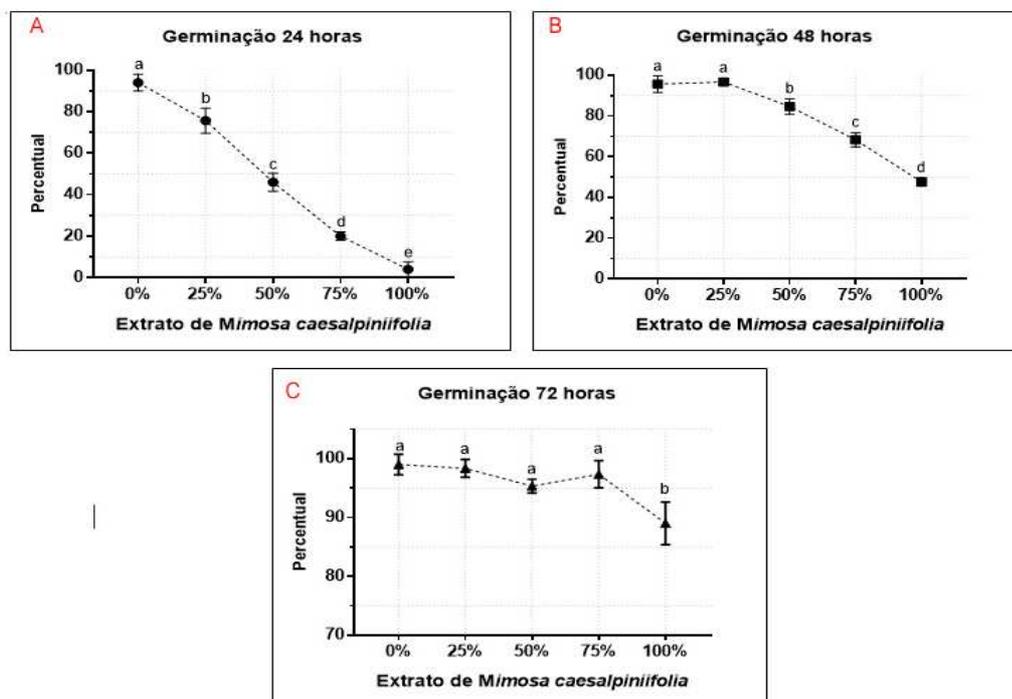


Figura 1. Taxas de germinação de sementes de *L. sativa* expostas ao extrato aquoso bruto de *Mimosa caesalpinifolia* nas concentrações de 0; 25%; 50%; 75% e 100% nos períodos exposição de: 24h (A), 48h (B) e 72h (C)

Fonte: elaborado pela autora

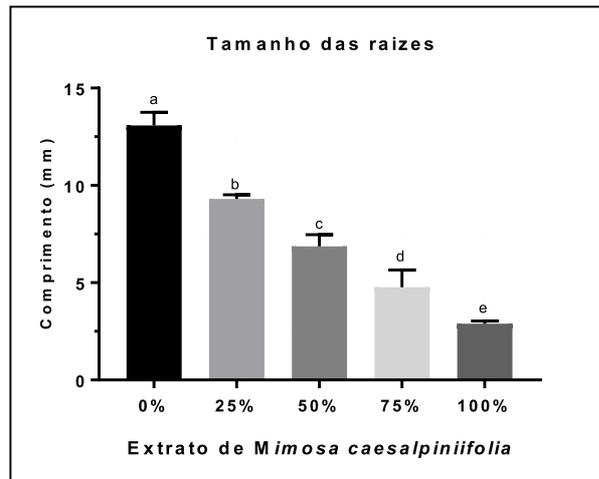


Figura 2. Comprimento radicular de *Lactuca sativa* expostas à diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de *M. caesalpiniiifolia* após 72h de exposição

Fonte: elaborado pela autora

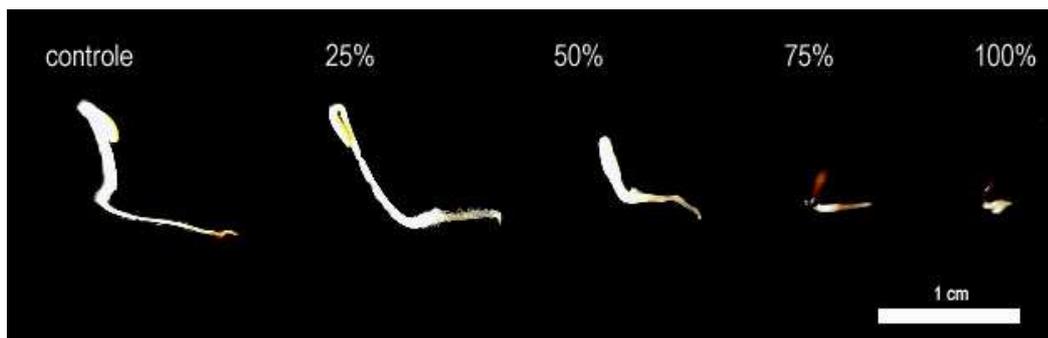


Figura 3. Desenvolvimento radicular de sementes de *L. sativa* expostas à diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de *M. caesalpiniiifolia* após 72h de exposição.

Fonte: elaborado pela autora

5.2 Análise do ciclo celular, aberrações cromossômicas, taxa de micronúcleo e índice de morte celular

Levando-se em consideração as análises de citotoxicidade, foi observado que todas as concentrações dos extratos de *M. caesalpiniiifolia* avaliadas aqui, à 72h de exposição, induziram a diminuição do índice mitótico nos meristemas radiculares de *L. sativa* quando os dados observados foram comparados aos dados do controle. Este decréscimo se deu de forma contínua de acordo com o incremento das concentrações dos extratos (Tabela 2).

Por outro lado, o incremento da concentração dos extratos de *M. caesalpiniiifolia* induziu um aumento do índice de alterações cromossômicas nos meristemas radiculares de *L. sativa* a 72h de exposição (Tabela 3) em comparação ao controle. Entretanto, os dados observados no tratamento a 25% de concentração não mostraram diferença significativa do controle. Dentre estas alterações foi possível observar metáfases com cromossomos aderentes (*stickness*), anáfases e telófases com pontes e fragmentações cromossômicas (Figura 4).

A taxa de micronúcleos apresentou diferença significativa em relação ao controle apenas na concentração de 100% a 72h de exposição, enquanto que a taxa de morte celular (núcleos heteropicnóticos) teve um crescimento significativo com o aumento das concentrações dos extratos, havendo diferença significativa apenas nas concentrações de 50%, 75% e 100% quando comparado ao controle (Tabela 4; Figura 5).

Tabela 2. Índice mitótico observado nos meristemas radiculares de *L. sativa* à 72h de exposição aos extratos de *M. caesalpiniiifolia*

Concentrações	Índice Mitótico (%)	Índice de aberrações cromossômicas (%)
Controle	25,6± 2,3 ^a	0,1 ± 0,12 ^a
25%	15,6± 2,1 ^b	0,3 ± 0,05 ^a
50%	13±1,5 ^b	1,6 ± 0,37 ^b
75%	7,6±1,4 ^b	2,0 ± 0,10 ^b
100%	6,3±3,0 ^b	2,3 ± 0,58 ^b

*Significativamente diferente do controle; Teste de Tukey $p < 0,05$. Os dados apresentados são as médias obtidas seguidas de seus desvios padrões.

Fonte: elaborado pela autora

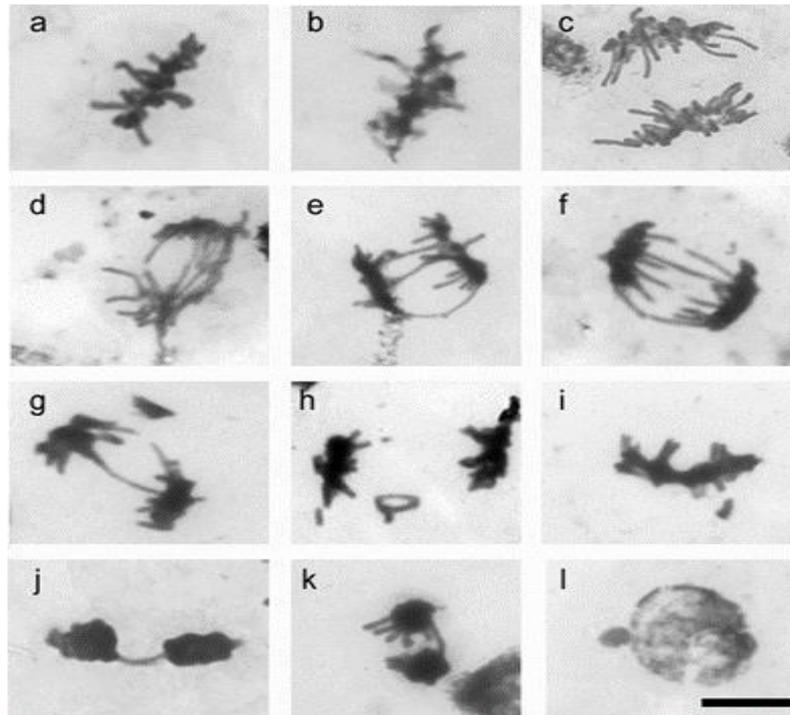


Figura 4. Representação das irregularidades: (a) metáfase normal; (b) metáfase stickness; (c) anáfase normal; (d-g) anáfase com várias pontes cromossômicas; (h) anáfase com fragmentos cromossômicos; (i) metáfase com fragmento cromossômico; (j-k) telófases com ponte; (l) micronúcleo. Bara= 10 µm

Fonte: elaborado pela autora

Tabela 3. Valor médio de aberrações cromossômicas observados meristemas radiculares de *L sativa* expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *M caesalpinifolia* por 72h

Concentrações (%)	Metáfase stickness (%)	Anáfase com ponte (%)	Telófase com ponte (%)	Fragmentos cromossômicos (%)
Controle	4,66 ± 2,08 ^a	2,33 ± 2,51 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25%	12,00 ± 6,00 ^a	5,33 ± 2,45 ^a	0,33 ± 0,50 ^a	0 ± 0 ^a
50%	29,00 ± 5,13 ^b	28,66 ± 1,15 ^b	3,33 ± 3,21 ^a	0 ± 0 ^a
75%	34,00 ± 7,21 ^b	31,33 ± 2,88 ^b	8,67 ± 4,04 ^b	1,33 ± 1,30 ^a
100%	42,66 ± 6,43 ^b	35,66 ± 6,08 ^b	12,00 ± 3,00 ^b	10,35 ± 1,52 ^b

*Significativamente diferente do controle; Teste de Tukey $p < 0,05$. Os dados apresentados são as médias obtidas seguidas de seus desvios padrões.

Fonte: elaborado pela autora

Tabela 4. Taxas de micronúcleos e núcleos mortos observados em meristemas radiculares de *L sativa* expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *M caesalpinifolia* por 72h

Concentrações (%)	Taxa de micronúcleos (%)	Taxa de morte celular (%)
0	0 ^a	1,01 ± 0,13 ^a
25%	0 ^a	1,89 ± 0,15 ^a
50%	0,66 ± 0,52 ^a	2,94 ± 0,86 ^b
75%	0,73 ± 0,55 ^a	2,73 ± 0,87 ^b
100%	1,89 ± 0,61 ^b	4,75 ± 0,71 ^b

*Significativamente diferente do controle; Teste de Tukey $p < 0,05$. Os dados apresentados são as médias obtidas seguidas de seus desvios padrões.

Fonte: elaborado pela autora

5.3 Teste de Tunel e citometria de fluxo

Foi possível observar que, com o aumento na concentração dos extratos, também ocorreu incremento nas taxas de morte celular pela avaliação do percentual de núcleos heteropicnóticos e normais. Extratos entre 50%-100% induziram um maior índice de mortes celulares de forma significativa em comparação ao controle (Tabela 5). Da mesma forma, pelo teste de Tunel, foi possível observar que nessas concentrações ocorreram taxa elevada de núcleos com danos severos ao DNA, um indicativo de morte celular (Figura 5; Tabela 5).

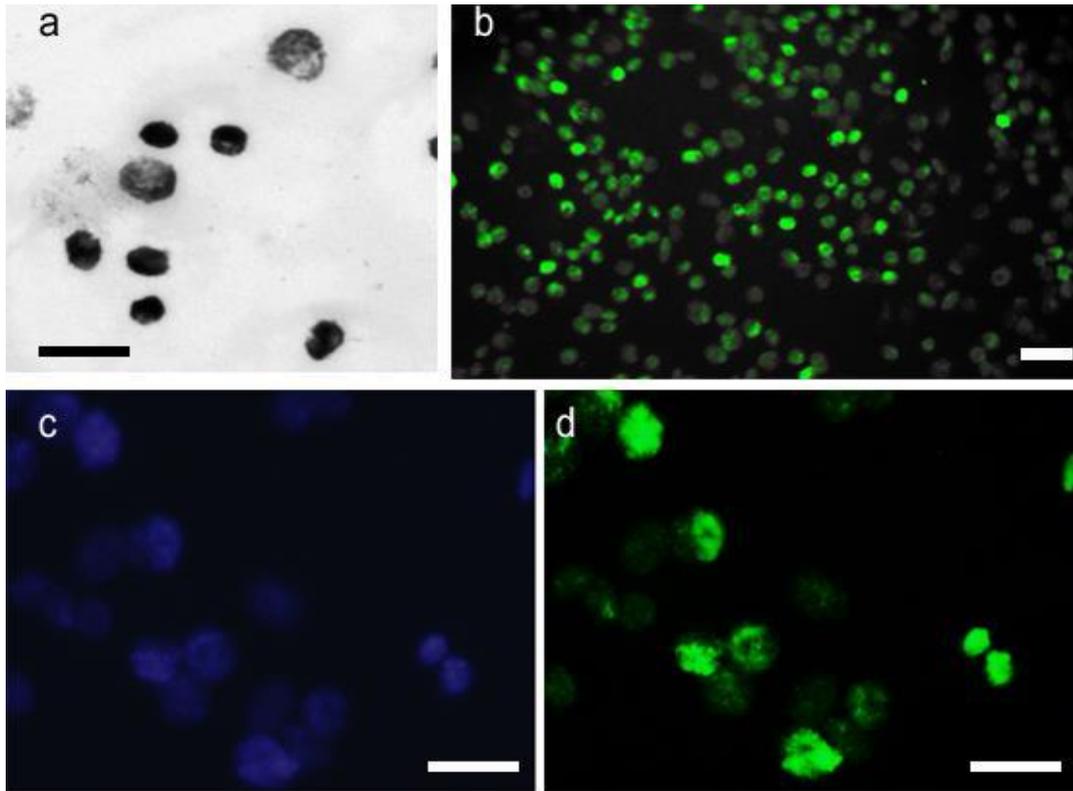


Figura 5. Núcleos heteropicnóticos indicando morte celular (a); Campo visual indicando células com fragmentação do DNA (verde), como um indicativo de morte celular (b); Detalhes de células com ausência de danos, danos leves e danos severos ao DNA pelo teste de TUNEL. Barra = 20 μ m

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5. – Classificação de núcleos apresentando ausência de danos, danos leves e danos severos ao DNA por meio do teste de TUNEL

Concentração	Núcleos sem danos (%)	Núcleos com danos moderados (%)	Núcleos com danos severos (%)
Controle	96,00 \pm 0,88	2,17 \pm 0,30	1,82 \pm 0,78
25%	95,70 \pm 0,96	2,69 \pm 0,51	1,60 \pm 0,44
50%	76,26 \pm 0,99*	16,66 \pm 2,81*	7,07 \pm 2,12*
75%	76,57 \pm 1,44*	19,53 \pm 1,54*	3,89 \pm 0,75*
100%	39,46 \pm 6,34*	36,41 \pm 2,75*	24,12 \pm 2,81*

*Significativamente diferente do controle; Teste de Tukey $p < 0,05$. Os dados apresentados são as médias obtidas seguidas de seus desvios padrões.

Fonte: elaborado pela autora

Os resultados obtidos com a citometria de fluxo, mostraram que o tratamento à 100% apresentou aumento de células na fase sub G1 do ciclo celular (Figura 6), o que pode, segundo a literatura, pode estar relacionado à um incremento da taxa de morte celular. Os dados obtidos para os extratos entre 50%-100% apresentaram diferenças quando comparados ao controle.

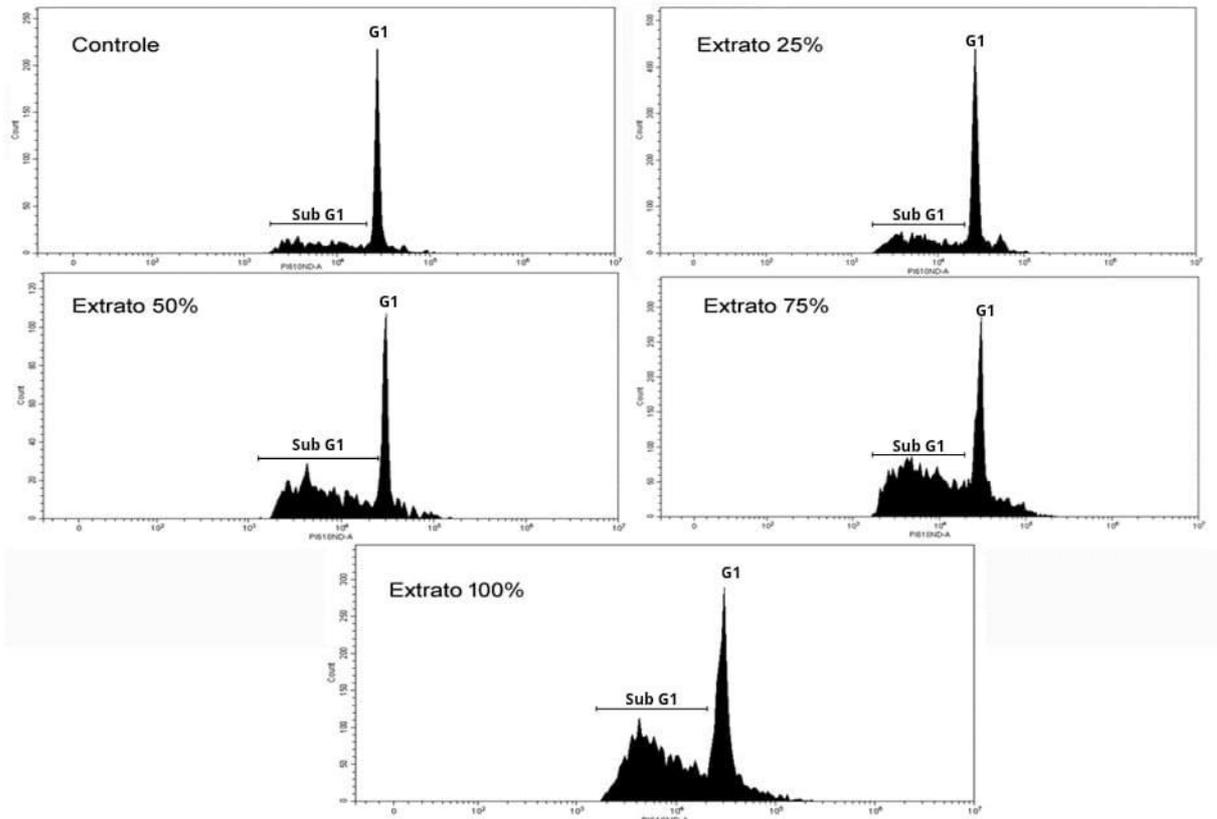


Figura 6. Histogramas mostrando o incremento de célula/eventos na fase sub G1

Fonte: Elaborado pelo autora

5.4 Testes fitoquímicos e de estresse enzimático

Os teores de fenóis nos extratos de *M. caesalpinifolia* estão representados na Tabela 6. Nota-se que não houve diferença estatística significativa entre os teores de fenóis encontrados nas amostra, o que sugere que os extratos possuem composições semelhantes mesmo após o processo de liofilização. No teste de identificação de taninos é possível observar, na Figura 7, presença de precipitado

esbranquiçado indicando a complexação tanino-gelatina nas quatro amostras. Na avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, os resultados não demonstraram diferenças as amostras como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 6. Teores de fenóis nos extratos liofilizados de *M. caesalpinifolia*

Amostras	Fenóis EAT (mg AT/g) \pm DP
100%	112,71 \pm 63,50 ^a
75%	87,85 \pm 52,86 ^a
50%	90,54 \pm 25,08 ^a
25%	94,83 \pm 33,33 ^a

DP – Desvio padrão; EAT – Equivalentes de ácido tânico. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). Análise estatística realizada por teste de ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p > 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

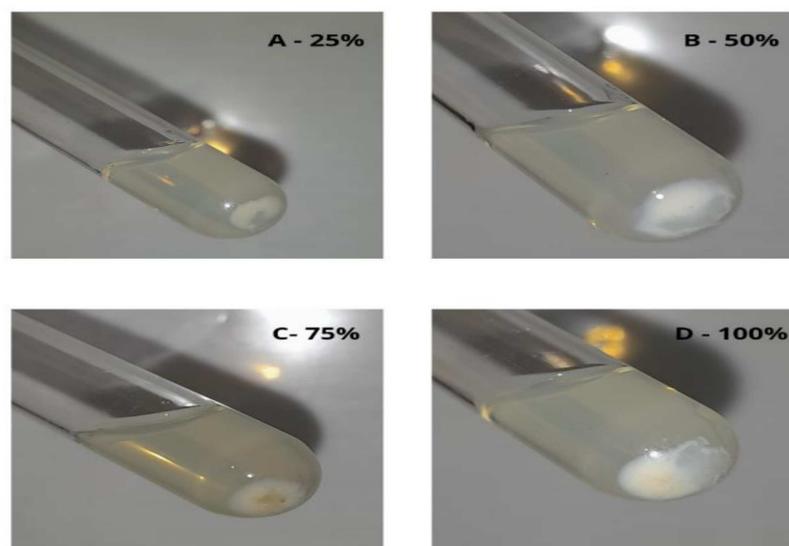


Figura 7. Amostras com precipitação indicando presença de taninos nos extratos de *M. caesalpinifolia*

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH

AMOSTRAS	CI ₅₀ (µG/ML) MÉDIA ± DP
100%	12,15 ± 1,20****a,b
75%	10,14 ± 1,05****a,c
50%	14,50 ± 0,54****b
25%	8,87 ± 1,37****c
Quercetina	0,17 ± 0,08

CI₅₀ – Concentração inibitória média; DP – Desvio padrão. Análise estatística realizada por teste de ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Valores significativamente diferentes da quercetina para **** $p < 0,0001$. Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p > 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

Como demonstrado na Figura 8, referente à identificação dos constituintes químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível observar que os cromatogramas das amostras possuem sinais semelhantes, demonstrando semelhança das amostras após o procedimento de liofilização, independentemente da concentração. Além disso, na figura 9, os sinais A, B, C e D representam espectros encontrados nas amostras apresentando máxima absorção próximo a 200, 240-280 e 300-380 nm, indicando características de flavonoides com absorção referente ao anel B (265 nm) e A (350 nm) do núcleo fundamental desse grupo, reforçando a predominância de flavonoides nas folhas da espécie (JANG et al., 2019).

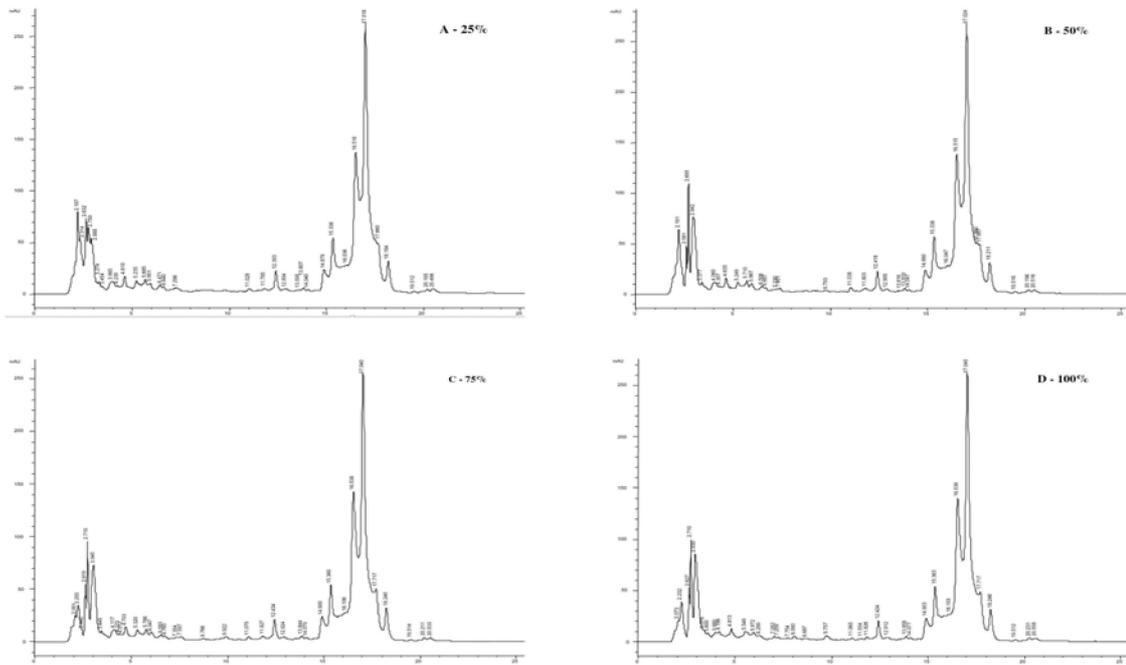


Figura 8. Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de *M. caesalpinifolia* (concentração 25%, 50%, 75% e 100%) por CLAE-UV

Fonte: Elaborado pelo autora

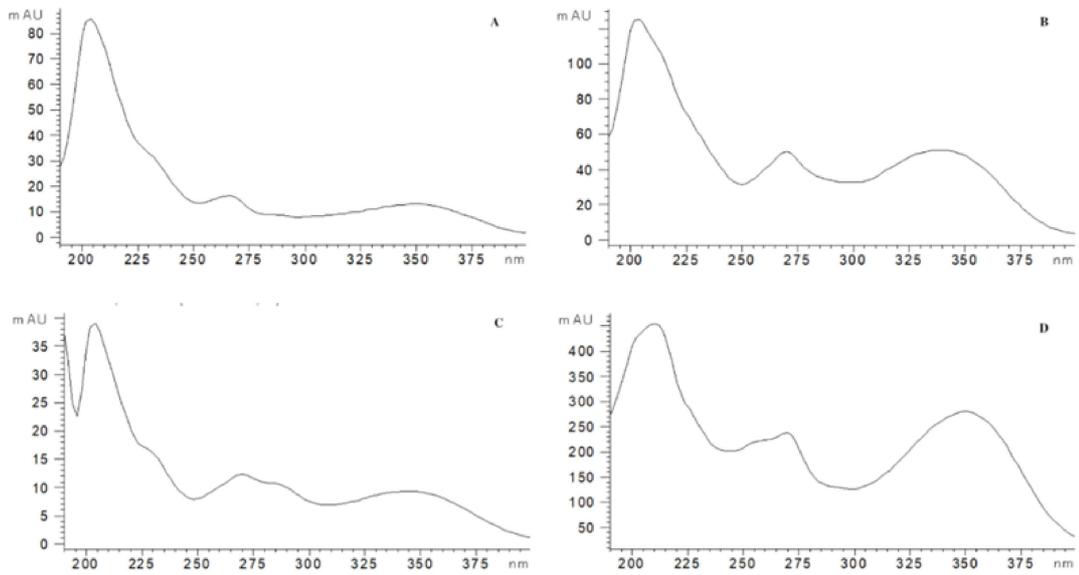


Figura 9. Espectros de flavonoides encontrados nas amostras

Fonte: Elaborado pelo autora

Não houve diferença significativa no conteúdo de proteínas solúveis totais entre os tratamentos. Também não houve significativa para a atividade da superoxidase dismutase (SOD), independentemente da concentração do extrato. Já para polifenol oxidase (POL), houve diferenças entre o controle e os demais tratamentos que, por sua vez, não diferiram entre si. Para catalase (CAT), não houve diferença entre o grupo controle e o tratamento com 25%, mas houve diferença entre esse tratamento e os tratamentos 50%, 75% e 100% que diferiram entre si. Por último, a atividade enzimática da peroxidase (POD), não apresentou diferenças entre os tratamentos 25% e 50%, entre os tratamentos 50% e 75% e entre os tratamentos 75% e 100%. Em suma, houve diferença significativa entre o grupo controle, o tratamento 25% e 50% e os tratamentos 50%, 75% e 100%. Os resultados estão representados na Figura 10.

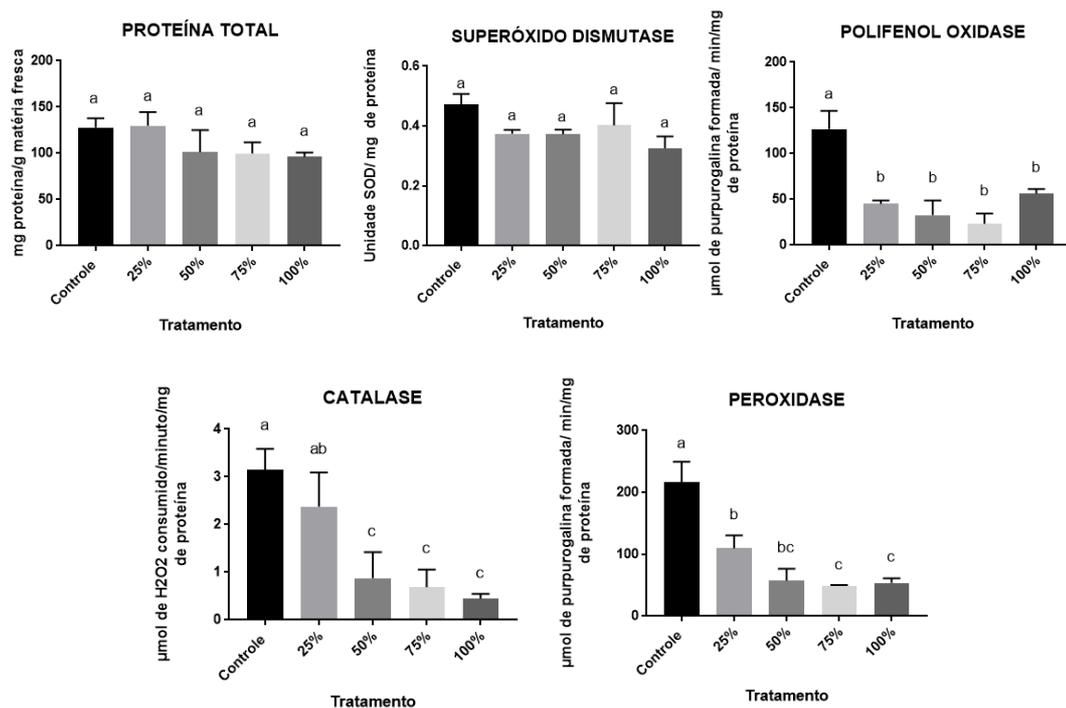


Figura 10. Médias dos conteúdos de **proteínas totais (A – mg g⁻¹ MF)**, **(B), catalase (CAT, µmol de H₂O₂ min⁻¹/ mg⁻¹ proteína)**, **(C), peroxidase (POD, µmol mg⁻¹ prot)** **(D), polifenol oxidase (PPO; µmol mg⁻¹ prot)** **(E), superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD mg⁻¹ proteína)** em sementes de *L. sativa* germinadas em placa de Petri, por 72 horas, contendo extrato aquoso de *M. caesalpinifolia* em quatro concentrações distintas (25%, 50%, 75% e 100%) e o controle contendo água destilada. Colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; n = 15. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). (a-c).

Fonte: elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

A germinação é o processo em que o embrião da semente se desenvolve em planta e que, basicamente, ocorre em três fases. A fase I que consiste na captação de água para o reinício das atividades metabólicas podendo ocorrer em condições anaeróbicas, baixas temperaturas, em sementes viáveis e dormentes, em tecidos vivos ou não. A fase II que se caracteriza pela drástica redução tanto na velocidade de hidratação quanto na intensidade de respiração. Já na fase III ocorre a visibilidade da retomada do crescimento do embrião pela protrusão da raiz (RAMALHO, 2017).

Tratando-se dos compostos aleloquímicos, a germinação tende a ser menos sensível que o crescimento da plântula, muitas vezes influenciando mais sobre a velocidade de germinação do que necessariamente a germinabilidade. Além disso, os aleloquímicos podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo que alterações no padrão de germinação podem ser resultado de efeitos sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do DNA, respiração, conformação enzimática e de receptores, funcionamento dos mensageiros secundários e/ou por sequestro de oxigênio (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

A redução das taxas de germinação e desenvolvimento radicular observadas no presente trabalho, indicam que *M. caesalpiniiifolia* apresenta atividade fitotóxica, sendo o extrato a 100% é o mais tóxico, inibindo a germinação, assim como o desenvolvimento radicular. As concentrações mais baixas inibiram a germinação nas primeiras 24 horas, mas assim como o extrato a 100%, também inibiram o desenvolvimento radicular em relação ao controle a 72h de exposição.

Alguns estudos também demonstraram resultados similares aos observados aqui em relação à fitotoxicidade da espécie. No estudo realizado por Piña-Rodriguez e Lopes (2001), por exemplo, em que se avaliou o potencial alelopático dos extratos das folhas de *M. caesalpiniaefolia* sobre as sementes de Ipê-amarelo (*Tabebuia alba*), foi observado maior inibição na velocidade de germinação na concentração 1:8 (maior concentração) em relação às demais, enquanto que o percentual de germinação das sementes não foi afetado.

Outros estudos envolvendo espécies da família Mimosaceae, corroboram com os achados neste estudo, indicando que o gênero *Mimosa* possui substâncias de caráter alelopático. Silveira e seus colaboradores (2012), por exemplo, avaliaram o

potencial alelopático do extrato aquoso das folhas da *Mimosa tenuiflora* sobre a germinação de sementes e crescimento de plântulas de *L. sativa* nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%, concluindo que, o extrato aquoso de folhas da *Mimosa tenuiflora* nas maiores concentrações, extraído a 100°C, reduziu a germinação e causou efeito alelopático negativo no desenvolvimento de plântulas de alface, inibindo o crescimento da raiz e aumentando a o número de plântulas anormais. Em outro trabalho, Santos e seus colaboradores (2018), também avaliaram o potencial alelopático do extrato aquoso de folhas secas de *Mimosa pudica* L., sobre a germinação e o crescimento inicial da alface e os resultados, da mesma maneira do que vem sendo indicado até aqui, demonstraram redução da germinação e no crescimento da alface em resposta ao aumento das concentrações.

Além das avaliações de fitotoxicidade, análises citológicas têm sido realizadas para avaliar a fitotoxicidade, contribuindo para a elucidação dos mecanismos de atuação de extratos vegetais no ciclo celular de biomodelos uma vez que os efeitos visíveis na germinação e crescimento de partes dos biomodelos são considerados manifestações secundárias da ação de compostos tóxicos nas células e moléculas de plantas receptoras, sendo resultados de alterações no ciclo celular, taxa de morte celular, aberrações cromossômicas e fragmentação do DNA (Carvalho *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019; Vasconcelos *et al.*, 2019).

Os resultados observados no presente estudo indicam que os extratos aquosos de *M. caesalpinifolia* possuem atividade citogenotóxica uma vez que a diminuição do índice mitótico, incremento de anormalidades cromossômicas e nucleares no ciclo celular de *Lactuca sativa*.

De acordo com Andrade *et al* (2010) a diminuição do índice mitótico indica uma perturbação na divisão celular com o bloqueio do início da prófase e, conseqüentemente, o impedimento da divisão celular (Sousa *et al*, 2009). Os efeitos citotóxicos causado pelo extrato aquoso de *M. caesalpinifolia* (concentrações 25 a 100%) nas células meristemáticas de *L. sativa*, observado no presente trabalho podem ter sido uma das causas da inibição do crescimento das raízes, visto que o alongamento radicular depende da divisão normal da célula no meristema radicular.

Quando os dados foram comparados ao grupo controle, observou-se que, além de diminuir a taxa de divisão celular, os extratos aquosos de *M.* também levaram

a um incremento de aberrações cromossômicas e da taxa de morte celular em *L. sativa*. O incremento do percentual de alterações cromossômicas em relação ao controle indica uma ação genotóxica de *M. caesalpinifolia*. Em geral as aberrações cromossômicas ocorrem devido a modificações na estrutura e/ou número de cromossomos (LEME & MARIN-MORALES, 2009). O tipo de alteração cromossômica induzida por um composto tóxico indica o modo de ação de tal composto sobre o material genético. Substâncias clastogênicas induzem quebras no DNA e as aneugênicas induzem modificações no fuso mitótico, levando a erros durante a separação de cromátides na mitose, o que pode resultar na eliminação de material genético e na formação de células poliploides ou aneuploides (FERNANDES *et al.*, 2007).

No presente estudo foi possível observar alterações cromossômicas devido a ações aneugênicas e clastogênicas. A aderência cromossômica ou metáfase *stickness* é caracterizada pela ação de substâncias tóxicas aos grupamentos fosfato do DNA durante a condensação ou pela formação de ligações inter e intracromatídicas durante a metáfase (BABICH, 1997; EL-GHAMERY *et al.*, 2003). Segundo El-Ghamery *et al.* (2003) essa anormalidade pode estar relacionada ao surgimento de quebras cromossômicas e formação de pontes entre as cromátides. Os dois tipos de alterações cromossômicas mais observados no presente trabalho foram cromossomos pegajosos e pontes cromossômicas (tanto em anáfase quanto em telófase), seguido de fragmentações, corroborando com o exposto por El-Ghamery *et al.* (2003). A formação de pontes cromossômicas é uma alteração clastogênica, diretamente ligada à perda de telômeros por quebras nas extremidades seguida pela união cromatídica, gerando cromossomos dicêntricos durante anáfases e telófases (Matsumoto *et al.*, 2006; Leme e Marin-Morales, 2009), segregação, fragmentos cromossômicos podem ser gerados, levando à perda de material genético e a um desbalanço de informações genéticas entre as células filhas geradas com a citocinese.

Os micronúcleos foram induzidos de forma significativa pela concentração de 100% do extrato de *M. caesalpinifolia*, concentração essa onde houve maior índice de pontes cromossômicas e fragmentações cromossômicas. Essas alterações indicam os efeitos mutagênicos de uma substância, originadas a partir de fragmentos e perdas cromossômicas que não foram incorporados ao núcleo durante o ciclo celular,

sendo formados para a exclusão de tais fragmentos ou cromossomos perdidos da célula (FENECH, 2000).

A citometria de fluxo mostrou que concentrações mais elevadas dos extratos de *M. caesalpinifolia* induzem um incremento na taxa de células em sub G1, indicando a presença de morte celular (ANDRADE-VIEIRA *et al.* 2012). O teste de TUNEL ainda indicou que os danos causados ao DNA das células meristemáticas de *L. sativa* podem ser classificados em danos leves e danos severos. Exatamente nas concentrações mais elevadas os danos severos tiveram sua taxa aumentada, indicando que os extratos são bastante tóxicos em concentrações elevadas e causam a morte celular, alguns trabalhos indicam resultados similares com tais ferramentas (ANDRADE-VIEIRA *et al.* 2012, SANTIAGO *et al.* 2017). Tais dados em adição aos observados pelo índice de morte celular e danos causados ao DNA (resultados do teste de TUNEL) indicam que os extratos de *M. caesalpinifolia* (50%-100%) induzem um incremento da taxa de morte celular

Quanto aos resultados das análises bioquímicas, segundo Oliveira *et al* (2020), o gênero *Mimosa* possui flavonoides (compostos fenólicos ou polifenóis) que são substâncias conhecidas por desempenharem atividade alelopática. Esses compostos são basicamente caracterizados pela presença de um sistema benzênico com um ou mais grupos hidroxila que podem ser encontrados metilados ou glicosilados. Fazem parte desses compostos os flavonóides (flavanóis, flavonóis, flavanonóis, flavonas e antocianinas), taninos, ácidos fenólicos, fenóis simples, ligninas, entre outros (ANGELO e JORGE, 2007).

Os taninos são substâncias capazes de formar complexos e precipitar proteínas, sendo classificados em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados formados a partir do chiquimato em que a hidroxila presente no açúcar é esterificada com os ácidos fenólicos e possui função de defesa contra a herbivoria. Já os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de unidades de flavonoides flavan-3-ol e/ou flavan3,4-diol resultantes do metabolismo do fenilpropanol 6,20-23 e possuem função de defesa contra microrganismos patogênicos (MELLO e SANTOS, 2001; HAGERMAN, 2012).

O teste de identificação de taninos com gelatina, baseiam-se na formação de complexo tanino-proteína, ou seja, correlacionam a capacidade adstringente que os taninos possuem com o ácido tânico (tanino hidrolisável) que é uma designação atribuída a um conjunto de substâncias amareladas que apresentam leve sabor adstringente pertencente à classe dos galotaninos (BRANDÃO *et al*, 2008). Assim, sugere-se, através da realização desse teste, a presença de taninos hidrolisáveis no extrato de *M. caesalpinifolia*.

Já a avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, determina a capacidade antioxidante de um composto através da transferência de um átomo de hidrogênio que causa neutralização ou redução de um radical livre, o DPPH, em 50% (OLIVEIRA, 2015). Os resultados obtidos aqui sugerem alta atividade antioxidante em relação ao padrão quercetina e, conseqüentemente, ação de mecanismo antioxidante nas folhas de *M. caesalpinifolia*. A quercetina pertencente a classe dos flavonóis e é um dos flavonóides com maior capacidade oxirredutora, ou seja, de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo inibir ou diminuir o estresse oxidativo nas plantas.

Silva e seus colaboradores (2012) analisaram o extrato etanólico das folhas de *M. caesalpinifolia* avaliando teor total de polifenóis e taninos (reação com gelatina, reação com sais de ferro, vapores de iodo e soluções de CeSO_4 , iodoplatinato e vapores de amônia e anisaldeído/ácido sulfúrico), tendo como padrão ácido gálico (tanino hidrolisável), além da ação antioxidante do extrato através do consumo do radical livre DPPH com o ácido ascórbico como padrão. Similarmente ao que observado no presente trabalho, os autores identificaram padrões que evidenciam presença de flavonoides derivados de quercetina e de ácido gálico, ou seja, de flavonoides e taninos, respectivamente. Além disso, a capacidade antioxidante foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais, sendo que a porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante e essa quantidade deve decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, a chamada concentração eficiente (C_{E50}) ou concentração inibitória (C_{I50}). Quanto maior o consumo de DPPH, menor a C_{E50} e, conseqüentemente, maior a sua atividade antioxidante, sugerindo-se que o extrato aquoso de *M. caesalpinifolia* possui alta atividade antioxidante e, provavelmente, alto teor de polifenóis.

Os mesmos autores citados anteriormente sugeriram correlações entre a capacidade antioxidante do extrato de *M. caesalpinifolia* e a atividade de oxirredução em espécies contendo taninos e flavonoides que podem contribuir tanto na prevenção quanto na redução de patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como, por exemplo, os antioxidantes agem na manutenção de baixos níveis de espécies não reativas de oxigênio (EROs) para evitar danos às células.

Em geral, as EROs servem como sinalizadoras para vias responsivas ao estresse. Para evitar um quadro de estresse oxidativo pelo aumento das concentrações de EROs, quando esses não são devidamente contidos pelo sistema antioxidante não-enzimático, desencadeia-se outra via de resposta provocada por esses estímulos, as enzimas oxidases (BOGUSZENWSKA e ZAGDAŃSKA, 2012). Dentre essas enzimas, podemos citar a superóxido dismutase (SOD) que constitui a defesa primária contra esses radicais, catalisando a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . A catalase (CAT) que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 (ALSCHER *et al.*, 2002). A peroxidase (POD) que catalisa a oxirredução entre H_2O_2 (NASCIMENTO & BARRIGOSSI, 2014) e a polifenol oxidase (PPO) que atua na hidroxilação de monofenóis produzindo o-difenóis e na remoção de hidrogênios dos o-difenóis, produzindo quinonas que polimerizam-se formando melaninas (PAS *et al.*, 2012).

Nota-se, pelos resultados obtidos no presente trabalho, que, embora não significativos, os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) sofreram uma queda nos quatro tratamentos quando comparados ao controle, sendo que estes mantêm certa linearidade de seus padrões, enquanto que os níveis de catalase (CAT), peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) decaíram bastante conforme o aumento das concentrações utilizadas dos extratos de *M. caesalpinifolia*, indicando que a espécie apresenta alguma substância, ou conjunto de substâncias que podem interferir negativamente na atividade das enzimas avaliadas, impedindo o sistema enzimático do biomodelo usado de realizar sua função de defesa aos estressores encontrados nos extratos em teste.

Sunmonu e Staden (2013) avaliaram a atividade fitotóxica utilizando os extratos aquosos de folhas moídas de seis árvores do Sul da África (*Vachellia sieberiana*, *Albizia adianthifolia*, *Buddleja saligna*, *Combretum kraussii*, *Halleria lucida* e *Rapanea melanophloeos*) sobre as sementes de *L. sativa*. As concentrações

utilizadas de cada extrato foram 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0% e os níveis das enzimas CAT, SOD e POD foram avaliados no sétimo dia de teste. Das cinco árvores avaliadas, o extrato de *Albizia adianthifolia* causou decréscimo nos níveis das três enzimas nas sementes de alface em relação ao grupo controle, ou seja, os níveis das enzimas diminuíram conforme a concentração do extrato aumentou. O mesmo padrão foi observado para os extratos de *Halleria lucida* e *Rapanea melanophloeos* para SOD e POD, mas não inicialmente para CAT que teve seus níveis aumentados em relação ao controle na concentração de 0,25% e, depois, queda progressiva chegando a níveis na maior concentração que o grupo controle, sendo que esse mesmo comportamento foi observado nas espécies *Buddleja saligna* e *Combretum kraussii* nos níveis de CAT, SOD e POL. Os autores supõem, que em respostas aos compostos alelopáticos presentes nos extratos vegetais, houve indução enzimática como mecanismo de defesa à presença de aleloquímicos, mas que o estresse causado não foi suficiente e as EROs geradas eram mínimas em baixas concentrações podendo, assim, as enzimas SOD, POD e CAT ainda terem ação de eliminação das espécies reativas de oxigênio.

Já o trabalho realizado por Lara-Nuñez e seus colaboradores (2016) investigou o efeito do estresse alelopático pelo lixiviado de *S. Deppei* (Cucurbitaceae) no sistema antioxidante do tomate, questionando se a inibição radicular na germinação estaria associada a um desequilíbrio e se o estresse induzia defesa ou morte celular neste. A concentração do extrato era de 1g/ 100ml e os períodos analisados foram 12hs, 24hs, 48hs e 72hs. As enzimas superóxido dismutase e catalase foram analisadas, bem como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Comparando os tratamentos com o controle, no período de 72hs, a atividade da SOD decresceu, ou seja, os níveis da enzima caíram drasticamente em relação ao grupo controle, porém, em relação a CAT, mesmo os níveis da enzima terem diminuído nos períodos de 12 e 24hs, aumentaram em 48 e 72hs quase linearmente. Segundo os autores, a SOD, além de ser considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, também atuam na regulação da concentração intracelular de superóxido (O_2^-) e no equilíbrio oxidativo da célula, sendo que os níveis de superóxido (O_2^-) foram baixos no período 48hs e 72hs. Além disso, indicaram que a queda inicial da catalase se deve ao baixo nível de H_2O_2 , visto que essa enzima catalisa a dismutação dessa EROs em H_2O e O_2 .

Um outro estudo, realizado por Silva e Gomes (2016), que teve por objetivo avaliar a fitotoxicidade de extrato e frações obtidas da casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* em plântulas de alface, as sementes do biomodelo foram expostas às concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL do extrato. Sete dias após a germinação, as amostras foram avaliadas quanto a sua atividade enzimática. Para o tratamento feito com o extrato bruto os valores encontrados em relação ao controle foram: para SOD todos os tratamentos tiveram valores acima do grupo controle; para POD apenas o tratamento 500µg/mL foi superior ao controle; para CAT todos os valores foram superiores e o tratamento 500µg/mL foi o menor valor; para PPO o tratamento 500µg/mL foi igual ao controle e o tratamento 250 e 1000µg/mL foram inferiores. Para os autores, a substância responsável pela atividade alelopática presente nas amostras poderia ter inibido a atividade da POD em relação ao tratamento teste 1000 µg/mL e que esses aleloquímicos estimularam o aumento da atividade da POD simulando ataque de algum microrganismo, o que explicaria o aumento da atividade da enzima no tratamento 500 µg/mL.

7 CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados com o extrato aquoso de *Mimosa caesalpiniiifolia* sobre as sementes de *Lactuca sativa* é possível indicar que a espécie possui atividade fitogenotóxica sobre tal biomodelo e que sua ação alelopática se dá no retardo inicial da germinação das sementes de alface e no comprometimento do desenvolvimento radicular, causando comprometimento do metabolismo antioxidante e danos significativos ao DNA que podem levar a morte das células.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1331-1341, 2002.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p. 1247-1257, 1995.
- ANDRADE, L.F., DAVIDE, L.C., GEDRAITE, L.S. 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**, 2010 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.012>

ANDRADE, S. F.; SARTORI, R. A.; ANDREADE, A. C. S. **Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth na germinação de espécies nativas**. Departamento de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa Institucional de Iniciação Científica do CNPq, 2017.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of Landfills Assessed by Plant Cytogenetic Approaches. In: CABRAL, G. B. C.; BOTELHO, B. A. E. (Org.). **Landfills: Waste Management, Regional Practices and Environmental Impact**. New York: **Nova Publishers**, v. 1, p. 319-330, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAGÃO, F. B, et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Rev. Biol. Trop**, v. 65, n 2, p. 435-443, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v65i2.25696>

ARAÚJO, B. Q, et al. 3-O-Acyl Triterpenoids and Antileishmanial Effect of the Ethanolic Extract from *Mimosa caesalpinifolia* Inflorescences. **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n 00, 2020. <http://dx.doi.org/10.2174/2212796814666200124120712>

ARAÚJO, H. T. N, et al. A alelopátia aumenta o potencial invasor de *Cryptostegia madagascariensis* Bojer ex Decne. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14, n.25, 2017.

ARAÚJO, J. B. S; PAES, J. B. Natural Wood Resistance of *Mimosa caesalpinifolia* in Field Testing. **Floresta e Ambiente**; 25(2): e20150128, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.012815>

BACHHETI, A., et al. **Plant Allelochemicals and Their Various Applications**. In: MÉRILLON, J. M; RAMAWAT, K, G. Co-Evolution of Secondary Metabolites. Editora: Springer International Publishing, 2019. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_14

BABICH, H. The “*Allium*” Test: A Simple, Eukaryote Genotoxicity Assay. **Am. Biol. 61 Teach**, 1997 <https://doi.org/10.2307/4450386>

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem**. Orlando, v. 44, n. 1 , p. 276-287, 1971.

BOGUSZENWSKA, D.; ZAGDAŃSKA, B. ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. In: Lushchak, V.; Semchyshyn, H. M. (eds). **Oxidative stress – molecular mechanisms and biological effects**. **InTech Janeza Trdine**, Rijeka, Croatia, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30. 1995.

BRANDÃO, L. F. G.; COSTA, C.M.D.; LACERDA, D.P.; SIQUEIRA, J.M. /Revista **Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n.3, p. 33 - 38, 2008.

CALLOU, M. J. A., *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth (sabiá). **Scientia Plena**, v. 8, n.1, p. 1-7, 2012.

CARVALHO, M.S.S, *et al.* Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. **Sci. Hortic.** (Amsterdam), 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.001>

CAVALCANTI, F.R.; *et al.* Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 591-600, 2007.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2:764-775, 1955.

CHAMPAGNE A, BOUTRY M. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. **Biochim Biophys Acta**. 2016 Aug;1864(8):1039-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.010>

CHENG, F; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Front. Plant Sci.*, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01020>

COSTA, L. A. S. **Primeira lista de plantas tropicais propostas como padrões de referência para estimativa de tamanho do genoma por citometria de fluxo**. Universidade Federal De Pernambuco Centro De Biociências Departamento De Botânica. RECIFE, 2018.

ÇELIK, T. A. Introductory Chapter: Cytotoxicity. IN: Cytotoxicity, Çelik, T. A. **IntechOpen**, 2018. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77244>

DAMASIO, J. F. **Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso, Brasil**. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade do Estado do Mato Grosso, Alta Floresta.

DEL LONGO, O. T.; *et al.* Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant & Cell Physiology**, v.34, n.7, p. 1023-1028, 1993.

DIAS, G. M. D, *et al.* Grouping of anthurium genotypes based on genetic and morpho-anatomical features. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p. 341-349, 2017.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics** 38 (3): 285-302, 1997.

DRAGOEVA, A. P, *et al.* Allelopathic Effects of *Adonis vernalis* L.: Root Growth Inhibition and Cytogenetic Alterations. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v.4, p.48-55, 2015.

- EL-GHAMERY, A.A., EL-KHOLY, M.A., ABOU EL-YOUSER, M.A. 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*, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00052-4)
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen*, 2000. [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. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.88, 252–259, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 12, (Edição Especial), p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: *Artmed*, 323 p, 2004
- FERRERA, E. G. B. S, et al. Efeito alelopático do extrato aquoso de sabiá na germinação de sementes de fava. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 3, p. 463-467, 2010.
- FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophan in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 73, n. 2, p. 627-648, 1927.
- GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (biología)*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009
- GATTI, A. B, et al. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotelochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta bot. Bras*, v.24, n.2, p 454-461, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000200016>
- GŁĄB L, et al. Allelopathic potential of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in weed control: A comprehensive review. *Advances in Agronomy* v.145, p. 43–95, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2017.05.001>
- Hagerman, A. E. **Fifty years of polyphenol-protein complexes. p.71-97. In: Recent advances in polyphenol research.** vol. 3. 3rd ed. Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P. and Quideau, eds. John Wiley & Sons, Ltd., Oxford, UK, 2012.
- HAQ I., RAJ A., MARKANDEYA AS. Biodegradation of Azure-B dye by *Serratia liquefaciens* and its validation by phytotoxicity, genotoxicity and cytotoxicity studies. *Chemosphere*, v. 196, p. 58-68, 2018.
- HAQ, I AJAY S. Kalamdhad. Phytotoxicity and cyto-genotoxicity evaluation of organic and inorganic pollutants containing petroleum refinery wastewater using plant bioassay, *Environmental Technology & Innovation*, v.23, 202. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101651>.

HSU, S-H; KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 83-90, 2003.

ISTIFLI, E. S; ILA, H. B. Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. Ed. IntechOpen. First published in London, United Kingdom, 2019.

KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiol.** Rockville, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

LARA-NUNEZ, A. et al. Allelochemical stress causes 355 Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.349-355, 2016. inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant, Cell and Environment, v. 29, p 2009-16, 2006.

LELES, D. **Avaliação ecotoxicológica de efluente têxtil com corante utilizando sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa***. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LARCHER, W. A Planta Sob Estresse: Ecofisiologia Vegetal. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.341-478, 2000.

LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal, São Carlos, SP: **RiMa**, 531 p, 2006.

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

LOUREIRO, J., et al. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. **Annals of Botany**, v.100, n.4, p.875–888, 2007. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm152>

LOWRY, O. H.; *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275, 1951.

MATSUO, M., *et al.* High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 levels result in accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis thaliana shoots and roots. **Molecular Plant**, v.8, n.8, p. 1253-1273,2015.

MEDEIROS, H. L. S, et al. DORMANCY OVERCOMING AND PRECONDITIONING IN *Mimosa caesalpinifolia* Benth. SEEDS. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 33, n. 3, 2020. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n315rc>

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFGRS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543, 2001.

MONÇÃO, N. B. N, et al. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpinifolia* Benth, a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, n. 39, 2014. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.139773>

MORSI, M. M; ABDELMIGID, H. M. Allelopathic activity of *Eucalyptus globulus* leaf aqueous extract on *Hordeum vulgare* growth and cytogenetic behaviour. **Australian Journal of Crop Science** 10(11):1551-1556 (2016) ISSN:1835-2707 doi: 10.21475/ajcs.2016.10.11.PNE122.

NARWAL, S. S. Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassay. **Allelopathy: Field Observations and Methodology. Joudpur: Scientific Publisher**, p.255-6, 1996.

NASCIMENTO, J. B; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.1, n.1, 2014.

NOIROT, M., et al. Nucleus– cytosol interactions – a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Ann. Bot.**, v.86, p. 309–316, 2000 <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.2000.1187>

OLIVEIRA, I. S. R, et al. *Mimosa caesalpinifolia* Benth. adapts to rhizobia populations with differential taxonomy and symbiotic effectiveness outside of its location of origin. **FEMS Microbiology Ecology**, v.95, 2019. <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiz109>

OLIVEIRA, L, G, A, et al. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) Dc. (asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.7, n.12, 2011.

OLIVEIRA, Y. R et al Potencial Alelopático de Espécies da Família Fabaceae Lindl. **Ensaio e Ciênc.**, v. 24, n. 1, p. 65-74, 2020.

ORR, S. P; RUDGERS, J. A; CLAY, K. Invasive plants can inhibit native tree seedlings: testing potential allelopathic mechanisms. **Plant Ecology**, v.181, p. 153–165, 2005.

PAS, R, et al. Determinação do substrato de maior afinidade com a polifenoloxidase parcialmente purificada de raízes de mandioca. **Horticultura Brasileira**, v.30, 2012.

SILVA, P. C.; GOMES, M. O. FITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DE *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng). Cabrera PHYTOTOXICITY OF *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.17, n.2, 2016.

PELLICER, J; LEITCH, I.J. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. **Methods in Molecular Biology**, v.1115, p.279–307, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_14

PINTO, H. C. A. **Potencial fitorremediador de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* benth.) associada a fungo micorrízico arbuscular em solo contaminado com óleo diesel**. D. 2016. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes.

PIRES, N.M; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. IN: OLIVEIRA JR, R. S; CONSTANTIN, R; INQUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba. **Omnipax Editora**, p-95-124, 2011.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) **Sandw**, v. 8, n.1, p.130 - 136, 2001.

POLYAK, Y, M; SUKCHAREVICH, D. V. Allelopathic Interactions between Plants and Microorganisms in Soil Ecosystems Y. M. **Biology Bulletin Reviews**, v. 9, n. 6, p. 562–574, 2019. <https://doi.org/10.1134/S2079086419060033>

RAMALHO, L. B. Hidrocondicionamento em sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. e efeitos em condições de estresse salino. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Engenharia Agrônoma). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28:123-130. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/SJhZbnN94KKSksvg9TKy4Zb/?lang=pt&format=pdf>

ROGEROA, S. O, et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, Vol. 6, No. 3, 317-320, 2003.

ROSHCHINA, V. V. Cellular models to study the allelopathic mechanisms. **Allelopathy Journal**, v.13, n.2, p 3-16, 2004.

SANTOS, F.E. 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.**, v.26, p. 27558–27568, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1015-x>

SANTOS, M. F, et al. POTENCIAL. Allelopathic potential of aqueous extract of *Mimosa pudica* L. on the initial growth of *Lactuca sativa* L. **Conexão Ci.** Formiga/MG, v 13, n 4, p. 39-45, 2018.

SILVEIRA, G. L. **Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.** 2016. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVEIRA, P. F, et al. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2012.

SOARES, E. V. **Bioensaios de fitotoxicidade e biodegradabilidade em amostras de um lixiviado de aterro sanitário tratado pela reação ferrioxalato.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental). Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo.

SODAEIZADEH, H; HOSSEINI, Z. Allelopathy an Environmentally Friendly Method for Weed Control. **International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2012)** Turkey, 2012.

SOLTYS, D, et al. Allelochemicals as Bioherbicides - Present and Perspectives, Herbicides - Current Research and Case Studies. IN: Use, Andrew J. Price e Jessica

A. Kelton, **IntechOpen**, London, UK, 2013; pp. 517–542. <https://doi.org/10.5772/56185>

SOUSA, S.M., SILVA, P.S., CAMPOS, J.M.S., VICCINI, L.F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of verbenaceae. **Caryologia**, v.62, p. 326–333, 2009. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589698>

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

SUNMONU, T. O, STADEN, V. Phytotoxicity evaluation of six fast-growing tree species in South Africa. **South African Journal of Botany**, v 90, p. 101–106, 2013.

SWIECH, J.N.D; Estudo fitotóxico e enzimático de *Philodendron meridionale* em sementes de *Lactuca sativa* L. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 1, pág. e5610111336, 2021. <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11336>

TEIXEIRA, E. O, et al. Potencial invasor de *Mimosa caesalpinifolia* Benth em área de plantio abandonado de *Corymbia citriodora* (hook.) k.d. hill & l.a.s. Johnson no interior da Floresta Nacional do Rio Preto, Conceição da Barra, Es. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017.

TEIXEIRA, R. O. **Influência da serapilheira de sabiá *Mimosa caesalpinifolia* Benth na germinação e crescimento de espécies florestais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais E Florestais) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ, 2013.

TERCEIRO, A. J. M. D; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do infuso das folhas de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos De Medicina**, v. 1, n.12, 2020.

TENENBOIM H, BROTMAN Y. Omic Relief for the Biotically Stressed: Metabolomics of Plant Biotic Interactions. **Trends Plant Sci.** 2016, v.21, n.9, p. 781-791. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.009>

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

VIEIRA, L. F. A, et al. Cytogenetic bioassays as tools to distinguish between toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 66, n. 2, p. 495-502, 2018. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33377>

XAVIER, M. V.B, et al. Management of *Oncideres ocularis* Thomson in *Mimosa caesalpinifolia* Benth. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4601>

ZERLIN, J. K. **Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. contra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.** 2015. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.