



MARCOS SCHLEIDEN SOUSA CARVALHO

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ALELOPÁTICA E AÇÃO NO CICLO CELULAR DOS
EXTRATOS DE HORTALIÇAS NÃO CONVENCIONAIS**

LAVRAS – MG

2017

MARCOS SCHLEIDEN SOUSA CARVALHO

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ALELOPÁTICA E
AÇÃO NO CICLO CELULAR DOS EXTRATOS DE HORTALIÇAS NÃO
CONVENCIONAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Marcos Schleiden Sousa.

Triagem fitoquímica, atividade antioxidante, alelopática e ação no ciclo celular dos extratos de hortaliças não convencionais / Marcos Schleiden Sousa Carvalho. - 2017.

85 p.

Orientadora: Luciane Vilela Resende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Hortaliça não convencional. 2. Triagem fitoquímica. 3. Alelopatia. I. Resende, Luciane Vilela. II. Título.

MARCOS SCHLEIDEN SOUSA CARVALHO

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ALELOPÁTICA E
AÇÃO NO CICLO CELULAR DOS EXTRATOS DE HORTALIÇAS NÃO
CONVENCIONAIS**

***PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT ACTIVITY, ALLELOPATHY AND
ACTION IN THE CELLULAR CYCLE OF UNCONVENTIONAL VEGETABLES
EXTRACTS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de março de 2017.

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes UFLA

Prof. Dr. Wilson Magela Gonçalves UFLA

Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes UFU

Profª. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

À minha família em especial à minha mãe, dona Maria do Remédio, por toda dedicação
voltada aos seus filhos;
À minha tia Maria do Socorro pelo carinho de mãe que recebo desde criança;
À Professora Maria das Graças Cardoso pela atenção dada em todas as etapas do doutorado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, pai todo poderoso, por sua infinita bondade. Muito obrigado, meu Deus, pela fé que me leva a prosseguir e pela minha família.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitotecnia e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia pela oportunidade de estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e ao CNPq e FAPEMIG pela concessão dos recursos financeiros necessários para a realização da pesquisa.

À Professora Maria das Graças Cardoso pelos incentivos, torcida, apoio moral, coorientação, disponibilidade de tempo, ensinamentos didáticos e ensinamentos para a vida. Obrigado, Professora Graça, pela oportunidade de trabalharmos juntos e pelo belo coração que você tem. À professora Larissa Fonseca Andrade Vieira pela coorientação, auxílio incondicional e disponibilidade de tempo nos momentos de dúvida do experimento e nas sugestões da tese. À Prof. Luciane pela orientação, aulas ministradas, aprendizado, sugestões da escrita da tese e pela paciência.

À Professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva e à Professora Maria das Graças Cardoso pelo incentivo na busca para o Doutorado Sanduíche. Essa etapa só foi possível graças ao estímulo que essas duas professoras me proporcionaram no decorrer do curso. Saibam que serei eternamente grato por isso.

Aos meus pais (Francisco e Maria) e irmãos (Mara e Júnior) pelo incentivo em toda tomada de decisão que eu escolhi nas diferentes etapas da vida. Vocês foram e sempre serão a minha base. Muito obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha namorada, Rhonda Ralph, pelo companheirismo, pela ajuda na língua inglesa e pelo seu enorme carinho. Isso foi primordial na finalização desse trabalho.

Aos alunos de graduação e pós-graduação das coorientadoras Maria das Graças Cardoso e Larissa Fonseca Andrade Vieira nos laboratórios de Química Orgânica e Citogenética da Universidade Federal de Lavras e aos estagiários da orientadora Luciane Vilela Resende com a condução de campo e laboratório das hortaliças não convencionais.

Ao professor Luiz Antônio Augusto Gomes pela amizade, pessoa solícita, humilde e de grande disposição para ajudar. Obrigado por disponibilizar as sementes de alface que utilizei no experimento do laboratório de Citogenética.

À Marli dos Santos Túlio, secretária do PPG Agronomia/Fitotecnia, pelos vários momentos de ajuda no decorrer do curso.

Aos professores da banca de defesa da tese (Drº Luiz Antônio Augusto Gomes, Drº Marcos de Souza Gomes, Drª Maria das Graças Cardoso e Drº Wilson Magela), muito obrigado por aceitarem o meu convite e pela ajuda prestada.

Aos Professores da Massey University – New Zealand: Dr. Nick Roskruge, Dr. Julian Heyes e Dr. Xiong He, pela complementação dos estudos de Doutorado na Massey University. Muito obrigado pela amizade, orientações e apoio incondicional em todas as etapas do experimento.

Aos funcionários da Massey University: Steve Ray, Craig McGill, Jessica Schnell, Chris Rawlingson, Sunmeet Bhatia, Brian Smith, Burt Jordan, Denise Stewart, Lesley Taylor, e Lindsay Sylva. Muito obrigado pela ajuda que tive ao longo dos experimentos de campo e nos laboratórios.

Ao Carlos Balate pela pessoa íntegra com um grande coração amigo e aos colegas de república pelo convívio e vários momentos de descontração.

Muito obrigado

The ability to do what needs to be done regardless of the his inner feeling or conflict if it exists, is what makes a professional. It has nothing to do with their knowledge. No matter how tired you are, you have to find a way to dig deep down and make it happen. Challenges are what make life interesting, overcoming them makes them meaningful.

RESUMO

Hortalças não convencionais são plantas que, com distribuição limitada à determinada região, não fazem parte de uma cadeia produtiva à semelhança das hortalças convencionais. Existem várias famílias de plantas que constituem as hortalças não convencionais. Como exemplo cita-se a família Amaranthaceae, conhecida popularmente como caruru, tida como planta invasora de lavouras. Além dessas, existem outras hortalças não convencionais que são da família Solanaceae, Tropaeolaceae, Lamiaceae, dentre outros. Os objetivos deste trabalho foram realizar a triagem fitoquímica, avaliar o potencial antioxidante de hortalças não convencionais, e verificar a ação alelopática e o ciclo celular dos extratos dessas plantas. Na triagem fitoquímica, realizaram-se testes convencionais para verificar a presença de metabólitos secundários utilizando-se as seguintes espécies: *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus spinosus* L., *Amaranthus deflexus* L., *Stachys byzantina* K. Koch, *Solanum muricatum* e *Solanum betaceum* Cav. A atividade alelopática foi avaliada, usando as cinco espécies de *Amaranthus*. Na triagem fitoquímica, as cinco espécies de hortalças não convencionais apresentaram resultados positivos para taninos, sesquiterpenlactonas e outras lactonas; os testes foram positivos para azedinha (*Rumex acetosa* L.) e capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Observou-se que para os esteroides as espécies tomate de árvore (*Solanum betaceum* Cav.) e melãozinho (*Solanum muricatum*) deram resultados negativos. Em relação aos flavonoides, constataram-se resultados positivos apenas para o tomate de árvore (*Solanum betaceum* Cav.). Para os demais testes, os resultados foram negativos. Os extratos de *A. spinosum*, *A. viridis*, *A. deflexus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus* apresentaram reações positivas para ácido orgânico, carotenoides e esteroides, além de polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, azulenos, depsídeos, cumarinas e saponinas. A porcentagem de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radical ABTS e DPPH, para as cinco espécies estudadas, aumentou de acordo com o aumento da concentração, apresentando assim um efeito dose-dependente. Pelo método do complexo fosfomolibdênio, as espécies *T. majus* L. e *S. byzantina* K. Koch apresentaram maior atividade antioxidante. Das cinco espécies de hortalças avaliadas, a espécie peixinho (*S. byzantina* K. Koch) foi a que apresentou uma atividade antioxidante em todos os métodos avaliados. O efeito sinérgico desses metabólitos apresentou atividade alelopática no modelo *L. sativa* com fitotoxicidade expressiva, atuando, principalmente na ligação dos cromossomos com o fuso mitótico, impedindo a divisão celular. A espécie *A. spinosum*, que apresentou resultados positivos para todas as classes de compostos químicos observadas nos extratos, mostrou-se a espécie mais promissora para futuras investigações sobre a possibilidade de criação de bio-herbicidas a partir dos compostos isolados no seu extrato.

Palavras-chave: Hortalça não convencional. Triagem fitoquímica. Alelopatia. Citogenética.

ABSTRACT

Unconventional vegetables are not a part of a production chain similar to conventional vegetables due to their limited distribution to a certain region. There are many plant families of unconventional vegetables. As an example, there is the *Amaranthaceae* family, popularly known as Caruru, as considered an invasive plant to crops. In addition to these, there are also the *Solanaceae*, *Tropaeolaceae*, *Lamiaceae* and other non-conventional vegetable families. The objectives of this work were to conduct a phytochemical triage, evaluate the antioxidant potential of unconventional vegetables, and verify the allelopathy action and cellular cycle of the extract obtained from these plants. In the phytochemical triage, conventional tests were conducted to verify the presence of secondary metabolites in the following species: *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus pinosus* L., *Amaranthus deflexus* L., *Stachys byzantine* K. Koch, *Solanum muricatum* and *Solanum betaceum* Cav. The allelopathy activity was evaluated using the five *Amaranthus* species. In the phytochemical triage, the five species of unconventional vegetables presented positive results for tannins, sesquiterpen lactones and other lactones; the tests were positive for azedinha (*Rumex acetosa* L.) and capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Negative results were verified for the species of tomate de árvore (*Solanum betaceum* Cav.) and melãozinho (*Solanum muricatum*). Regarding the flavonoids, positive results were obtained only for tomate de árvore (*Solanum betacum*). For the remaining tests, the results were negative. The extracts obtained from *A. spinosum*, *A. viridis*, *A. deflexus*, *A. hybridus* and *A. retroflexus* presented positive reactions to organic acid, carotenoids and steroids, as well as polysaccharides, proteins, amino acids, azulenes, depsides, coumarines and saponins. The percentage of antioxidant activity, verified using the ABTS and DPPH free-radical scavenging methods, for the five species studied, increased according to the increase in concentration, thus presenting a dose-dependent effect. By means of the phosphomolybdenum complex method, species *T. majus* L. and *S. byzantine* K. Koch presented higher antioxidant activity. Of the five species evaluated, peixinho (*S. byzantine* K. Koch) presented antioxidant activity for all methods. The synergistic effect of these metabolites presented allelopathy activity for the *L. sativa* model, with expressive phytotoxicity, acting, especially in the chromosomal bondage with the mitotic spindle, preventing cell division. Species *A. spinosum*, which presented positive results for all classes of chemical compounds verified in the extracts, was the most promising for future investigation on the possibility of creating a bio-herbicide from compounds isolated from its extract.

Keywords: Non-conventional vegetable. Photochemical triage. Allelopathy. Cytogenetics.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Substâncias naturais produzidas pelos metabolismos primários e secundários.....	20
Figura 2 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante.....	22
Figura 3 - Estabilização do radical DPPH por um antioxidante.....	23
Figura 4 - Reação de redução do molibdênio por um composto antioxidante.	24

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1. Percentage of the antioxidant activity of plants <i>Rumex acetosa</i> L., <i>Tropaeolum majus</i> L., <i>Solanum muricatum</i> , <i>Stachys byzantina</i> K. Koch and <i>Solanum betaceum</i> Cav. the method of inhibiting the ABTS radical. The means followed by the same letter: in lower case are the comparison of concentrations in each plant and the upper letter of each concentration compared between diferente plants do not differ significantly at probability of 5%, by Scott-Knott test. *BHT = Butyl hydroxy toluene.	56
Figure 2. Antioxidant stabilizing ABTS radical and formation of potassium persulfate.....	56
Figure 3. Percentage of the antioxidant activity of plants <i>Rumex acetosa</i> L., <i>Tropaeolum majus</i> L., <i>Solanum muricatum</i> , <i>Stachys byzantina</i> K. Koch and <i>Solanum betaceum</i> Cav. by DPPH radical inhibition method. The means followed by the same letter: in lower case are the comparison of concentrations in each plant and the upper letter of each concentration compared between different plantsdo not differ significantly at probability of 5%, by Scott-Knott test. *BHT = Butyl hydroxy toluene.	56
Figure 4. Antioxidant stabilizing DPPH [•] radical. *AO-H = representation of an antioxidant substance.....	57
Figure 5. Reduction of ferricyanide ion to ferrocyanide.....	57

ARTIGO 2

- Figura 1 - Inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* expostas por 48 h à cinco concentrações (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 g/L) de extrato etanólico de cinco espécies de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. hybridus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L. e *A. retroflexus*.72
- Figura 2 - Efeitos dos extratos de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L., *A. hybridus* L., e *A. retroflexus* sobre o desenvolvimento inicial (crescimento radicular e da parte aérea) de plântulas de *Lactuca sativa*.....74
- Figura 3 - Exemplo de alterações no ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos de *Amaranthus sp*: (A1 e A2) heterocromatização do núcleo interfásico dos extratos (Setas); (B) ponte em anáfase; (C) fragmento (Seta); (D) cromossomos aderentes; (E) c-metáfase; (F) poliploide; (G) cromossomo não orientado.77
- Figura 4 - Distribuição das aberrações cromossômicas observadas no ciclo celular de células meristemáticas da ponta radicular de *Lactuca sativa* expostas a extratos etanólicos de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L., *A. hybridus* L., e *A. retroflexus*.79

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Table 1.** Metabolites whose results were positive in phytochemical screening for ethanol extracts of *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum*, *Stachys byzantina* K. Koch and *Solanum betaceum* Cav.54
- Table 2.** Antioxidant activity of *Rumex acetosa* L. (sorrel), *Tropaeolum majus* L. (Capuchinha), *Solanum muricatum* (melaozinho), *Stachys byzantina* K. Koch (peixinho) and *Solanum betaceum* Cav. (tree tomato), by phosphomolybdenum complex and the reducing power methods.....57

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos de *Amaranthus sp.*70
- Tabela 2 - Parâmetro microscópico acessado em células meristemáticas de pontas de raízes de *L. sativa* após exposição de extratos etanólicos de *Amaranthus sp.*.....75

LISTA DE SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido)
BHT	Butilhidroxitolueno
BOD	Demanda bioquímica do oxigênio
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DPPH	2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazila
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
SISVAR	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Hortaliças Não-Convencionais.....	17
2.1.1 Família Amaranthaceae.....	24
2.1.2 <i>Amaranthus</i> usados como alimento	25
2.1.3 <i>Amaranthus</i> utilizados como medicamento.....	27
2.2 Alelopatia	27
2.2.1 A alelopatia como estratégia de manejo de plantas daninhas.....	29
2.2.2 Metabólitos secundários e ação dos aleloquímicos em plantas	31
2.3 A citogenética na agricultura	34
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37
ARTIGO 1 - PHYTOCHEMICAL SCREENING, EXTRACTION OF ESSENTIAL OILS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FIVE SPECIES OF UNCONVENTIONAL VEGETABLES	47
ARTIGO 2 - POTENCIAL ALELOPÁTICO E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CINCO ESPÉCIES DE <i>Amaranthus spp</i> NA PLANTA MODELO <i>Lactuca sativa</i>	61

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas é uma prática exercida ao longo da história da humanidade, bem como a sua domesticação. Os vegetais são utilizados em vários setores de pesquisa, tais como a área agrônômica, biológica, alimentar, farmacêutica, cosmética, dentre outras. Existem pesquisas que são realizadas na fitoterapia, por exemplo, em que o objetivo dessas atividades é detectar os principais grupos de compostos fitoquímicos presentes em plantas que, segundo a medicina popular, apresentem propriedades curativas.

De fato, as plantas têm capacidade de produzir substâncias químicas que podem contribuir para sua sobrevivência e/ou desenvolvimento de mecanismos de defesa. Essas substâncias são metabólitos bioativos (aleloquímicos) oriundos de seu metabolismo secundário. Esses componentes químicos permitem que as plantas produzam e estoquem compostos de natureza química de maneira que essas substâncias apresentem funções biológicas nas quais muitos desempenham um papel ecológico que se caracterizam por seus diversos usos e aplicações, tais como alimentos funcionais, medicamentos, inseticidas, herbicidas, perfumes, entre outros, podendo receber, também, a designação de produtos naturais (GARCÍA; CARRIL, 2009). Cozzolino (2009) mencionou que esses metabólitos podem ser encontrados em diversos vegetais que fazem parte da alimentação humana. O autor destaca, também, alguns benefícios que os metabólitos podem trazer à saúde humana, tais como a redução na incidência de certos tipos de câncer, estimulação do sistema imunológico, dentre outros.

Além de fazer parte da alimentação humana, os metabólitos secundários podem ser considerados como importantes fontes na busca de novos bioherbicidas, pois os extratos que são obtidos de algumas espécies de plantas podem demonstrar uma fitotoxicidade bem estabelecida, principalmente quanto a interações dos organismos nos ecossistemas naturais. Essa é a atuação da alelopatia, nas quais uma alternativa para o controle de plantas invasoras em agrossistemas. A obtenção de extratos de hortaliças não convencionais, por exemplo, pode ser um bom indicativo de espécies vegetais com potencial alelopático que podem complementar os sistemas de manejo no combate a diferentes plantas daninhas nas propriedades agrícolas.

Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010), destacam que as hortaliças não convencionais são plantas restritas a determinados locais e regiões, com distribuição limitada. No Brasil, essas plantas exercem função na alimentação e

cultura de algumas comunidades como, por exemplo, populações ribeirinhas e pequenos agricultores familiares. Atualmente, em função de mudanças no padrão alimentar e, principalmente, em virtude do processo de globalização, ocorreu uma redução do consumo dessas hortaliças. Diferentemente das hortaliças convencionais, as hortaliças não convencionais não estão organizadas em uma cadeia produtiva e, conseqüentemente, não despertam o interesse de empresas do setor agrícola.

No estudo dos metabólitos secundários, quando se obtém o extrato de plantas em laboratório, algumas outras plantas podem ser susceptíveis na presença desses metabólitos como, por exemplo, *Lactuca sativa* (alface), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Cucumis sativus* (pepino), consideradas assim indicadoras de atividade alelopática (TORRES et al., 2004). Millioli et al. (2007) mencionaram que as maneiras como são tratadas as obtenções dessas atividades alelopáticas podem ser por bioensaios de ecotoxicidade que são metodologias analíticas as quais permitem caracterizar a toxicidade de substâncias químicas em geral.

Os testes com vegetais superiores permitem detectar a citogenotoxicidade dos poluentes pela avaliação do ciclo celular de células de ponta de raízes. A utilização das raízes deve-se ao fato de ser a primeira parte dos organismos exposta aos agentes tóxicos dispersos no solo ou em água, portanto a análise das células radiculares constitui um método rápido para o monitoramento da toxicidade (FISKESJÖ, 1988). Além disso, a ponta de raiz é composta por tecido meristemático que sofre inúmeras e rápidas divisões celulares, o que possibilita a avaliação do índice mitótico e a frequência de aberrações cromossômicas.

Aliada às atividades descritas até então, tem-se associado análises de germinação e crescimento radicular. Esta combinação de análises macroscópicas (germinação e desenvolvimento inicial da plântula) e microscópica (índice mitótico e alterações no ciclo celular) é um importante método para determinar os efeitos tóxicos e sinérgicos de compostos lançados no ambiente (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram realizar a triagem fitoquímica, avaliar o potencial antioxidante de hortaliças não convencionais, e verificar a ação alelopática e ciclo celular dos extratos dessas plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Na produção de hortaliças, a globalização da economia tem causado alterações em todos os elos da cadeia produtiva brasileira desses vegetais. É fato que as cadeias produtivas das hortaliças têm conquistado avanços significativos, porém ainda existem desafios que precisam ser superados nos anos vindouros. O aumento do consumo desses vegetais, a expansão da base técnico-científica e o aumento na produção, devem ser investigados e pesquisados. Esse conjunto de fatores, na sua maioria, é voltado para a produção de hortaliças convencionais ou também conhecidas como tradicionais, tais como alface, alho, batata, beterraba, tomate, dentre outros. Além dessas hortaliças tradicionais, existem muitos outros alimentos nutritivos e saborosos que eram apreciados e faziam parte das refeições familiares, mas que foram, aos poucos, esquecidos ou desvalorizados. Alguns desses alimentos são as hortaliças denominadas não convencionais, de maneira que esses vegetais já estiveram presentes nas refeições familiares, porém com o passar dos anos foram, aos poucos, esquecidas e desvalorizadas. Apesar disso são de grande importância devido aos benefícios nutricionais e também ao fácil cultivo e manejo, visto que são plantas nativas (BRASIL, 2010).

Atualmente, há uma crescente busca por hábitos alimentares mais saudáveis voltados para uma alimentação balanceada, especialmente incluindo frutas e hortaliças. Entretanto, o consumo de frutas e hortaliças no Brasil, conforme estimativa, corresponde a menos da metade das recomendações nutricionais (LEVY-COSTA; SICHIERI; MONTEIRO, 2005). O baixo consumo de vegetais pode estar associado à rotina atual da maioria das pessoas residentes em grandes cidades, que consomem cada vez mais alimentos industrializados e também os chamados *fast foods* (KINUPP; BARROS, 2007). Entre as principais razões do abandono gradual desses alimentos estão as transformações oriundas da urbanização, da industrialização, do desenvolvimento de tecnologias, da expansão da indústria de alimentos, da difusão da mídia e do discurso científico, que afetam de forma diferenciada os grupos sociais de acordo com sua história e aprendizagem (ROTENBERG et al., 2012).

2.1 Hortaliças Não-Convencionais

O desconhecimento sobre a utilidade e forma de uso das plantas associados às tendências “modernas” resultou no uso reduzido de muitas plantas que faziam parte do cotidiano alimentar dos moradores de zonas rurais e periferias urbanas (SOUZA et al., 2009). Essas plantas são hoje denominadas hortaliças não convencionais. Consideram-se hortaliças não convencionais aquelas que, com distribuição limitada à determinada região, não fazem

parte de uma cadeia produtiva à semelhança das hortaliças convencionais (RIBEIRO et al., 2014).

São hortaliças folhosas, de frutos, raízes e tubérculos, cuja produção ocorre em pequena escala, destinando-se a mercados e consumidores específicos, e são de grande valor para as comunidades regionais. Em sua maioria, são ainda desconhecidas do grande público consumidor. Mas isso não significa que não tenham importância comercial. Há espécies que, devidamente avaliadas, têm potencial para fazer parte da cadeia produtiva das hortaliças, aos níveis local, regional ou nacional. Dessa forma, o pequeno agricultor poderá dispor de novas opções de cultivo, com materiais adaptados, e ampliar o leque de produtos disponíveis para o mercado consumidor (MELO; VILELA, 2007).

Essas hortaliças podem exercer grande influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais, mas não recebem o devido interesse da comunidade técnico-científica e, conseqüentemente, também não despertam o interesse de empresas das áreas de fertilizantes, sementes ou agroquímicos (BRASIL, 2010). Existem citações que denominam as hortaliças não convencionais como culturas subutilizadas. Segundo Brasil (2010), Eyzaguirre, Padulosi e Hodgkin (1999) e International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI (2006), culturas subutilizadas são aquelas que já foram largamente utilizadas e que caíram em desuso devido a fatores agrônômicos, genéticos, econômicos, sociais e culturais.

Seu consumo tem caído por não serem competitivas no mercado com as hortaliças modernas. Eyzaguirre, Padulosi e Hodgkin (1999) e IPGRI (2006) definem, também, as culturas negligenciadas (hortaliças não convencionais) como aquelas cultivadas primariamente em seus centros de origem ou diversidade por agricultores familiares, onde ainda são importantes para a subsistência das comunidades locais. Algumas dessas espécies podem ter distribuição global, mas tendem a ocupar nichos especiais (EYZAGUIRRE; PADULOSI; HODGKIN, 1999; IPGRI, 2006).

A maior parte dessas hortaliças possuem grande variabilidade genética devido ao processo de manutenção local das variedades. Ao mesmo tempo, estão vulneráveis ao processo de erosão genética por causa do êxodo rural, já que são mantidas, tradicionalmente, por pequenos agricultores e cultivadas para consumo familiar. Não sendo mais cultivadas, o germoplasma acaba se perdendo. Daí, a importância da coleta dessas hortaliças, pois muitas variedades locais poderão ser resgatadas e preservadas (MELO; VILELA, 2007).

As hortaliças não convencionais têm sido consideradas uma alternativa alimentar e uma diversificação cultural na atividade agrícola, principalmente na agricultura familiar de populações de baixa renda urbana e rural (ROCHA et al., 2008). Contudo, ainda não há

informação suficiente a respeito do valor nutricional dessas hortaliças, o que faz com que seu consumo seja reduzido (SOUZA et al., 2009). Atualmente, pesquisas têm sido realizadas com essas hortaliças em várias áreas do saber, por várias instituições como, por exemplo, a Universidade Federal de Lavras (CARVALHO et al., 2015; SAMARTINI, 2015; SAMARTINI et al., 2016; SILVA, 2015; SOUZA, 2016), inclusive sobre o possível potencial alelopático de algumas espécies.

Dentre essas hortaliças, algumas se destacam na culinária brasileira. Na região sudeste do Brasil, especificamente no estado de Minas Gerais, destaca-se a *Rumex acetosa* L. (**azedinha**), que é uma herbácea perene nativa da Europa e norte da Ásia (Eurásia), inclusive, considerada uma “planta daninha” naquele continente. Apresenta folhas acídulas, usadas em saladas cruas (puras ou mistas, proporcionando um frescor), como verdura, em sopas, purê ou molho verde (clorofila) e omeletes (KINUPP; LORENZI, 2014).

Outra hortaliça não convencional muito utilizada é a *Tropaeolum majus* L. (**capuchinha**). É uma planta herbácea anual, nativa das regiões montanhosas do México e Peru. É amplamente cultivada para fins ornamentais e para consumo na maioria das regiões do Brasil. Suas flores e folhas jovens podem ser utilizadas no preparo de saladas cruas para massas verdes, panquecas, pizzas, pães, cozidas com carne, sopas, dentre outras. A espécie *Stachys byzantina* K. Koch (**peixinho**), conhecida também como peixinho-de-horta, é uma hortaliça herbácea perene nativa da Turquia, Ásia e Cáucaso. É amplamente cultivada no sul e sudeste do Brasil para fins ornamentais em canteiro a pleno sol e para consumo como hortaliça. Suas folhas podem ser consumidas após cozimento e preparo culinário adequado, com textura leve e sabor de peixe-frito, daí alguns dos nomes populares: peixinho, peixinho-da-horta ou lambari-da-horta (KINUPP; LORENZI, 2014).

O **melãozinho** (*Solanum muricatum*), outra hortaliça não convencional, é um arbusto perene, com frutos com 10 a 15cm de comprimento. É uma planta da família das Solanaceae. Tem sabor adocicado e aroma semelhante ao melão (daí o nome, apesar das plantas não serem aparentadas). O **tomate de árvore** (*Solanum betaceum*), da família Solanaceae é um arbusto ereto, sublenhoso, perene, pouco ramificado, de 2,5 a 4,5 m de altura e nativo da Bolívia e Peru. Os frutos podem ser consumidos in natura, apresentando polpa succulenta amarela e de sabor subácido, com muitas sementes (KINUPP; LORENZI, 2014).

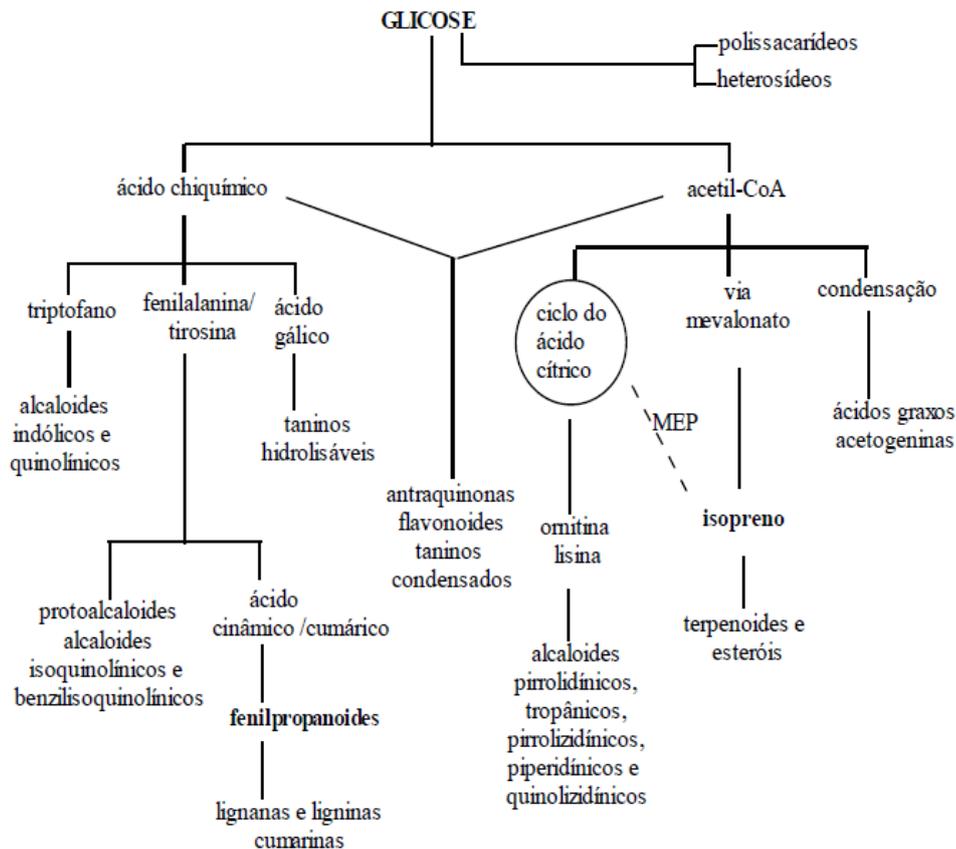
O **amaranto** (*Amaranthus spp*), outro exemplo de hortaliça não convencional, é uma cultura agrícola cujos grãos e folhas apresentam altos teores de proteína bruta, respectivamente, iguais a 18,88% (COSTA, 2007) e 21,92% (COSTA et al., 2008). Essa

planta tem, ainda, a vantagem de se adaptar às condições climáticas mais severas, semelhantes às das regiões semiáridas (OMAMI, 2005), como as predominantes no nordeste brasileiro.

Considerando a rusticidade de cultivo e as características nutricionais desejáveis, torna-se importante conhecer a constituição química dessas espécies citadas e de outras, por meio de uma prospecção preliminar que possa prever os grupos de metabólitos secundários nos extratos. As seguintes informações, referentes às figuras 1, 2, 3 e 4, foram obtidas de Santiago (2015).

A origem dos metabólitos secundários pode ser sumariada a partir do metabolismo da glicose, por meio de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (FIGURA 1). O ácido chiquímico é precursor de cumarinas, alcaloides (derivados dos aminoácidos aromáticos), lignanas, ligninas e fenilpropanoides; compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados desses, terpenoides e esteroides (BRAZ-FILHO, 2010; DEWICK, 2009).

Figura 1 - Substâncias naturais produzidas pelos metabolismos primários e secundários.



Fonte: adaptado de Simões et al. (2007).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados em sua forma livre, recebendo o nome de agliconas ou estarem ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando os heterosídeos. Ainda existem os polissacarídeos e ácidos graxos, considerados de origem primária, mas que exercem funções importantes como metabólitos secundários (CARDOSO et al., 2001).

Quando se trata do estudo dos metabólitos secundários, muitos assuntos são levados em questão em relação a esses compostos como, por exemplo, os radicais livres. Os radicais livres são muito importantes no estudo da química orgânica. Segundo Pereira e Cardoso (2012), o termo radical livre é, frequentemente, usado para designar toda espécie química capaz de apresentar orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Essa configuração confere a esses radicais uma grande capacidade de reagir com moléculas-alvo e os tornam altamente instáveis, com meia-vida curta. Os radicais livres são produzidos constantemente e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, exercendo funções biológicas relevantes no metabolismo (BARBOSA et al., 2010).

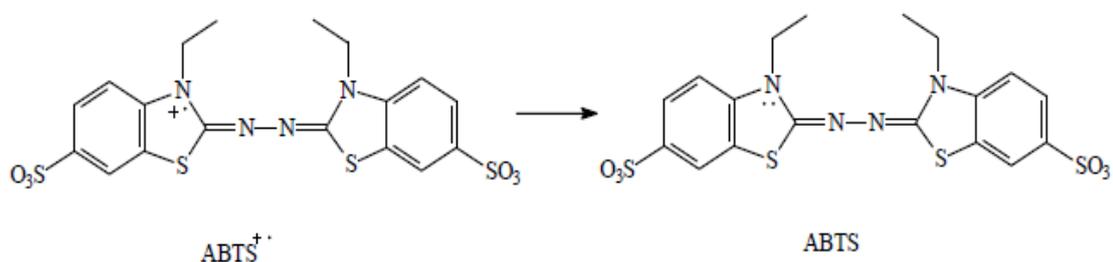
Algumas pesquisas já mostraram que determinados compostos presentes em extratos de plantas podem exercer ação antioxidante, e são indicados para atenuar ou prevenir os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular (ANDRADE et al., 2007; BALESTRIN et al., 2008). Dessa maneira, há um crescente interesse na busca de espécies vegetais que possam atuar no combate aos radicais livres. Assim, os antioxidantes são compostos químicos que atuam em diferentes níveis na proteção do organismo, capazes de interceptar os radicais livres e evitar a formação de lesões e a perda da integridade celular (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os compostos antioxidantes também são utilizados em alimentos gordurosos para retardar a sua oxidação, a qual pode alterar as suas características físicas e químicas, e promover o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis. A oxidação desses alimentos, além de torná-los impróprios para o consumo, podem provocar alterações que modificam não só a qualidade nutricional, mas também podem produzir compostos tóxicos. Os antioxidantes sintéticos BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol), dentre outros, são os mais utilizados na indústria de alimentos; entretanto, estudos toxicológicos têm demonstrado o potencial carcinogênico desses compostos em experimentos com animais (RAMALHO; JORGE, 2006). Devido à necessidade de proteção contra os radicais livres gerados pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, as plantas concentram uma grande diversidade de antioxidantes, e podem ser consideradas fontes de novos compostos que apresentem essa atividade (SILVA, 2015).

Existem diversos testes antioxidantes que envolvem desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; ALVES et al., 2010). Esses testes podem auxiliar os pesquisadores na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais, entre outros e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos e bebidas (ALVES et al., 2010). O método ABTS é baseado na neutralização do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) por um antioxidante. Esse radical pode ser gerado por meio de uma reação química utilizando dióxido de manganês, AAPH (2,2'-azobis amidinopropano dihidroclorídrico) ou persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), por reação eletroquímica ou enzimática (metamioglobina e peroxidase). Na presença de antioxidantes, pode-se medir a diminuição da formação desse radical, de cor verde-escura, por espectrofotometria, convertido em uma forma não colorida ou verde mais claro (FIGURA 2) (MAGALHÃES et al., 2008).

Os resultados podem ser expressos como equivalentes a uma solução de TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), por meio da construção de uma curva analítica com concentrações conhecidas de TROLOX. O valor da absorbância é proporcional à concentração do radical catiônico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ remanescente e é medida após um tempo de reação fixado, determinando, assim, a porcentagem de inibição do radical por um composto puro, extrato ou óleo essencial (MAGALHÃES et al., 2008).

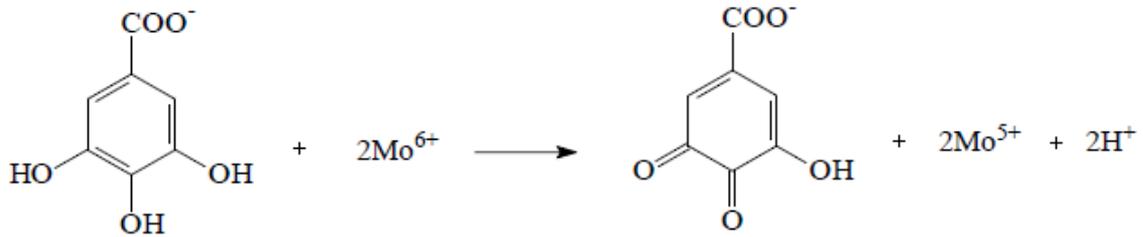
Figura 2 - Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante.



Fonte: Santiago (2015).

O teste DPPH avalia a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. É um método muito utilizado por ser um recurso fácil e preciso para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. A estabilidade do radical ocorre devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, conferindo a ela, uma coloração violeta,

Figura 4 - Reação de redução do molibdênio por um composto antioxidante.



Fonte: Santiago (2015).

Com base nas informações prestadas neste trabalho, uma ênfase será dada ao gênero *Amaranthus*, sobre o qual foram realizadas pesquisas focadas na triagem fitoquímica das espécies *Amaranthus spinosus* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus deflexus* L. e *Amaranthus retroflexus* L, em conjunto com a atividade alelopática dos extratos obtidos dessas plantas, por meio de bioensaios de germinação, desenvolvimento inicial da plântula e ciclo celular na planta modelo *L. sativa*.

2.1.1 Família Amaranthaceae

As amarantáceas são plantas que compreendem cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, a maioria de seus membros são anuais e perenes, alguns deles são arbustos ou pequenas árvores, que se adaptaram a solos ácidos e ambientes áridos. As folhas desse gênero são simples, alternadas ou opostas. Apresentam flores bissexuais ou unissexuais (monóicas ou dioicas), geralmente regulares e a semente é globosa a ovoide ou em forma de lente. As amarantáceas, em grande parte, se originam nas estepes da Ásia Central, embora algumas das espécies mais comuns do gênero *Amaranthus* sejam de origem americana; essas plantas foram usadas na América para fazer tanto farinha como bebidas, e também em rituais, devido ao seu conteúdo alcaloide (DE LA CRUZ, 1991; IZCO et al., 2004).

De acordo com Sphear (2007), o *Amaranthus sp.* é uma planta arbustiva, herbácea e anual. É dicotiledônea, possui inflorescência tipo panícula e apresenta cores que variam de verde a dourada, passando pelo roxo. Frequentemente, é classificada como falso cereal. Conforme o mesmo autor, essas plantas têm raízes pivotantes, com grande quantidade de ramificações e inúmeras radículas finas, que têm a capacidade de se estenderem rapidamente, criando condição favorável à absorção de água e nutrientes.

Existem gêneros que incluem espécies ornamentais como *Celosia cristata* que são plantas do gênero *Celosia*, essas apresentam uma flor que parece uma crista de galo, são chamados Chi Kuan na China (SURSE et al., 2014) e pertencem à classe *Magnoliopsida*,

ordem *Caryophyllales* e família *Amaranthaceae*, existem espécies de interesse econômico, como o *Amaranthus caudatus*. No entanto, várias espécies são consideradas invasoras e, certamente, algumas estão listadas entre as piores plantas daninhas do mundo como, por exemplo, *Amaranthus muricatus* (BUNCE et al., 2002; DANA; SANZ-ELORZA; SOBRINO, 2003; LAMBDOM et al., 2008; VILLARÍAS, 2006). Mais de 400 variedades de amarantos em torno do mundo, tanto em clima temperado e tropical, grosso modo, servem em uma das seguintes categorias: grãos, vegetais (hortaliça), ornamentais, alimentação animal e ervas daninhas, podendo alguma dessas espécies servirem para mais de uma finalidade. Dentro do gênero, as espécies empregadas como hortaliças, têm sido empregadas na China há mais de 400 anos, são também comumente encontradas no Caribe e África; grãos de amaranto foram cultivados e reverenciados pelos Astecas no México, os Maias na América Central e os Incas na América do Sul (GRUBBEN; DENTON, 2004).

Das várias espécies de amaranto, três foram selecionadas ao longo dos anos como escolha para consumo humano e animal: *A. hypochondriacus* e *A. cruentus* (amaranto roxo) comumente cultivadas para a produção de grãos e *A. tricolor* que é cultivada, principalmente, para a produção de folhas. Uma quarta planta, *A. caudatus* é uma espécie de produção de grãos, embora seja utilizada frequentemente como uma planta ornamental. Quando usadas como grãos, as variedades de *A. caudatus* são melhores adaptadas às terras tropicais altas. Outros amarantos são representados por *A. dubius*, *A. blitum* e *A. cruentus* (amaranto roxo). As espécies de plantas daninhas são representadas por *A. retroflexus*, *A. albus* (arbusto) e *A. spinosus* (amaranto espinhoso) espécies de ocorrência comum no Brasil (CHEEKE; BRONSON, 1980; POND; LEHMANN, 1989; MWANGI, 2003).

O amaranto tem um sistema fotossintético "C-4" (semelhante a plantas como milho e sorgo), o que lhe permite ser excepcionalmente eficiente na utilização de luz solar e nutrientes em altas temperaturas. É mais resistente à seca do que o milho e prospera em temperaturas de 30-35°C. É tolerante à baixa fertilidade e à seca, embora o mecanismo de tolerância não seja bem compreendido. Sob condições de estresse, a qualidade da planta torna-se pobre. O amaranto responde bem ao uso de fertilizantes (SINGH; WHITEHEAD, 1993).

2.1.2 *Amaranthus* usados como alimento

Valorizada pela civilização asteca nas Américas, as *Amaranthaceas* foram alimento básico e um símbolo venerado da cultura, conhecidas, atualmente, como falso cereal. Getahun (1976) já afirmava que a qualidade da proteína de amaranto é significativa em relação a outros grãos e que apresenta também, comparativamente, mais cálcio e ferro, muitas das espécies do

gênero *Amaranthus* são comestíveis. Algumas são cultivados para o consumo de folhas (por exemplo, *A. tricolor* e *A. Lividus*), enquanto outros, particularmente *A. hybridus* e *A. caudatus* são importantes na produção de grãos. Getahun (1976) cita também que na Etiópia, por exemplo, a semente de *A. Caudatus* é usada como alimento pela tribo Gumuz, além de serem empregadas na produção de cerveja local. Além disso, eles utilizam *A. caudatus* como planta cultivada e a semente é usada para preparar mingau na nação Sidamo.

O amaranto cresce rapidamente e tem tolerância a condições áridas e solos pobres onde alguns cereais não podem ser cultivados. O amaranto foi apresentado como um grão milagroso, super grão e o grão do futuro (EVGENY, 2001; SAMUEL, 1991). Várias espécies de amaranto, tais como *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus cruentus* e *Amaranthus hypochondriacus*, vêm sendo cultivadas na Argentina, Bolívia, Equador e Peru, e a espécie *Amaranthus caudatus* também tem sido cultivada na África (Etiópia, Quênia, Uganda) como grãos e hortaliças (TEUTONICO; KNORR, 1985; WILLINAMS; BRENNER, 1995). Segundo a Asociación Mexicana del Amaranto (2003) e Costa e Dantas (2009), o amaranto (*Amaranthus spp*) foi selecionado pela NASA (National Aeronautics and Space Administration), para ser utilizado na alimentação de astronautas em viagens espaciais, por apresentar elevado valor nutritivo e alta digestibilidade.

Além de se usar as folhas e os grãos desse vegetal na alimentação humana, o *Amaranthus* tem sido utilizado, também, como forragem para gado. As sementes podem ser moídas na fabricação de farinha, produção de pipoca e cozida como mingau. As folhas podem ser cozidas da mesma maneira que o espinafre. As folhas e as hastes são macias, cortadas e cozidas ou às vezes fritas em óleo e misturado com carne, peixe, sementes de cucurbitáceas, amendoim ou óleo de palma. Pratos com amaranto são comidos como prato principal com cereais ou tubérculos. Tradicionalmente, em regiões áridas, as folhas são secas e o pó da folha é usado em molhos, durante a estação seca (GRUBBEN; DENTON, 2004). Essas plantas constituem uma fonte alternativa de proteínas na dieta humana com vantagens sobre as proteínas animais, devido ao seu baixo teor de gorduras saturadas e ausência de colesterol (SAMARTINI, 2015).

Folhas de amaranto têm um alto teor de micronutrientes essenciais. Elas constituem boa fonte de vitaminas, incluindo vitamina A, vitamina K, Vitamina B6, vitamina C, riboflavina e folato, dietas minerais, incluindo cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, zinco, cobre e, especialmente, manganês (GRUBBEN; DENTON, 2004). Os grãos de amaranto não apresentam glúten e, portanto, são de fácil digestão, principalmente para

aqueles que se recuperam de alguma doença ou período de jejum (MORALES; LEMBCKE; GRAHAM, 1988).

2.1.3 *Amaranthus* utilizados como medicamento

Getahun (1976) relatava que as espécies de *Amaranthaceae* apresentam propriedades medicinais, e podem ser utilizadas para prevenir o crescimento retardado de crianças, aumentar o fluxo de leite materno, são consideradas, também, altamente benéficas no tratamento de gonorreia, além de beneficiarem pacientes com doença cardiovascular. O mesmo autor afirma que na Etiópia, a raiz de *Amaranthaceae* é usada como laxante e a semente serve para expulsar vermes do gênero *Taenia*, podem servir também para o tratamento de doenças oculares, amebiana, disenteria e queixas de mama.

Amaranthus caudatus e *Amaranthus sylvestris* são usados como um expectorante de *Taenia*. *Amaranthus Spinusus* Linn. pode ser utilizado como laxante, diurético e digestivo. Também é usado no tratamento de anorexia, hanseníase, doenças do sangue, sensação de ardor e bronquite. Essa planta é relatada, ainda, como tendo propriedades anti-inflamatórias, atividade imunomoduladora e efeito em hematologia (ASSIAK et al., 2002; HUSSAIN et al., 2009). Estudos mostraram propriedade antidiabética de *Amaranthus Spinusus* Linn. (GIRIJA; LAKSHMAN, 2011; SANGAMESWARAN; JAYAKAR, 2008).

Reyad-ul-Ferdous et al. (2015) avaliando o potencial biológico de *A. viridis* em ratos, observaram que o extrato bruto das folhas possuía potente propriedade anti-inflamatória, apoiando, com isso, o uso folclórico dessa planta no tratamento de várias situações inflamatórias (SRAVAN et al., 2011).

2.2 Alelopatia

O termo "alelopatia" foi criado em 1937, pelo pesquisador alemão Hans Molisch, com a união das palavras gregas "*allélon*" e "*pathos*", que significam, respectivamente, mútuos e prejuízo. Segundo Molisch, "alelopatia é a capacidade das plantas produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente, influenciam de forma favorável ou desfavorável o desenvolvimento de outras plantas" (SANTOS, 2012, p. 4).

A Sociedade Internacional de Alelopatia (SIA) define o termo alelopatia como "A ciência que estuda qualquer processo que envolva metabólitos secundários produzidos pelas plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos" (TORRES et al., 1996, p. 25).

As substâncias alelopáticas provêm do metabolismo secundário, atribuem-nas a função de defesa e/ou proteção, pois durante o processo de evolução destas plantas essas substâncias

representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento e desenvolvimento das plantas (MANO, 2006). Os aleloquímicos presentes nas plantas (raízes, folhas, etc) são liberados no ambiente ou, então, por meio da decomposição do material dessas plantas. Segundo Alves et al. (2003), tem-se aumentado o interesse na exploração da alelopatia como uma alternativa estratégica, principalmente, para o controle de ervas daninhas, mas também, de insetos e doenças. Esses autores mencionam que ervas daninhas podem ser controladas pelo crescimento de plantas capazes de exudar aleloquímicos ou pela incorporação de resíduos de plantas com alto teor de aleloquímicos no solo. Muitos metabólitos secundários, como substâncias fenólicas e terpenóides, são capazes de influenciar o ciclo de nutrientes, aumentando ou reduzindo a disponibilidade destes em sistemas terrestres e aquáticos (INDERJIT; NISHIMURA, 1999). O estresse nutricional pode levar diretamente à interferência competitiva e, também, pode ocasionar aumento da produção de substâncias alelopáticas em plantas cultivadas ou em plantas daninhas (KLEIN; BLUM, 1990; RICE, 1984). Esta reciprocidade de ações entre competição e alelopatia dificulta e, praticamente, inviabiliza a separação desses fenômenos a campo (DAKSHINI; FOY; INDERJIT, 1999; INDERJIT; DEL MORAL, 1997).

A alelopatia é um fenômeno produzido por plantas, e este não se trata de uma competição, pois não ocorrem disputas por recursos limitados (DIAS et al., 2005; FERREIRA; ÁQUILA, 2000). O que difere a alelopatia da competição entre plantas é o fato de a competição reduzir ou remover do ambiente um fator de crescimento necessário para ambas as plantas, como água, luz, nutrientes e outros, enquanto a alelopatia ocorre pela adição de um fator químico ao meio. Nos ecossistemas agrícolas, a ocorrência da alelopatia é muito importante na determinação da interferência entre culturas e comunidade infestante (FELIX, 2012). Contudo, para uma determinada quantidade de substância alelopática, o aumento da densidade de planta-alvo diminui o efeito alelopático, embora aumente a interferência por competição (WEIDENHAMER; HARTNETT; ROMEO, 1989) o que possibilita a distinção entre os dois fenômenos em condições controladas.

Para Almeida et al. (2008), os efeitos alelopáticos de uma planta são aceitos, desde que seja comprovado que um inibidor químico efetivo seja produzido e ocorra numa concentração potencialmente efetiva e que a inibição não seja por efeito de competição da planta por luz, água e nutrientes, nem por uma atividade animal. Conforme Borella e Pastorini (2009), os efeitos alelopáticos podem ser resultados de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. A capacidade das plantas de produzir aleloquímicos em todos os seus

órgãos e sua concentração nos tecidos depende de diversos fatores, como solo, temperatura e pluviosidade.

Os compostos alelopáticos podem afetar vários processos na planta, tais como a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteína, a atividade de várias enzimas e a perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (MANO, 2006). O interesse na exploração de compostos do metabolismo secundário tem sido visto como uma alternativa estratégica na agricultura, inclusive para o controle de ervas daninhas (ALVES et al., 2003). Essa é uma atividade que pode trazer um interesse muito grande por parte de empresas do setor de proteção de plantas, pois a incorporação desses metabólitos como atividade alelopática na agricultura podem ser uma opção no sentido de reduzir o uso excessivo de herbicidas sintéticos que na maioria das vezes, por conta do mal uso, tornam-se danosos ao meio ambiente.

2.2.1 A alelopatia como estratégia de manejo de plantas daninhas

Nos últimos anos, o estudo de compostos alelopáticos tem avançado muito na perspectiva da sua manipulação para aplicações práticas na agricultura, como por exemplo, para controlar pragas e plantas invasoras (MAULI et al., 2009). A alelopatia pode ser útil na busca por fitotoxinas naturais e de derivados sintéticos a serem empregados como herbicidas naturais, pois podem ser mais específicos em sua ação e menos prejudiciais ao meio ambiente. Assim pode-se reduzir, ou eliminar a contaminação do ambiente, na preservação de recursos naturais e na garantia da produção de produtos agrícolas com alta qualidade, desprovidos de resíduos de agentes contaminantes (BORELLA; PASTORINI, 2009).

Pensando na tomada de decisão no quesito estratégias de manejo de plantas daninhas com o uso da alelopatia no campo, pode-se destacar a utilização de espécies de cobertura morta com maior potencial alelopático e a seleção de genótipos com maior potencial alelopático. É fato que o uso de coberturas mortas (restos vegetais) é a estratégia utilizada com maior êxito na agricultura, uma vez que o manejo de plantas daninhas através do uso de coberturas vegetais tem se intensificado pela possibilidade de redução dos custos de produção dos produtos agrícolas. Atualmente, a busca por produtos de origem natural que causem baixo impacto ambiental estimula a pesquisa com produtos naturais, os projetos no âmbito da alelopatia podem ser uma alternativa interessante e viável para obtenção de novas substâncias que venham atender às necessidades atuais e futuras da agricultura (SANTOS, 2012).

Pensando, também, no uso de algumas hortaliças não convencionais não apenas como alimento, mas sim como cobertura morta, não foi encontrada na literatura nenhuma informação relacionada até a presente data que tenham feito o uso específico dessas hortaliças para esse fim, porém acredita-se que, pela demanda de algumas dessas espécies em vários locais de cidades e em áreas de agricultura, pode-se fazer uso dessa atividade com hortaliças folhosas. Existem muitas pesquisas com inúmeras espécies cultivadas que são utilizadas como plantas para cobertura do solo, verde ou morta, com o objetivo de reduzir a infestação de plantas daninhas, onde são atribuídos efeitos alelopáticos a espécies cultivadas existindo, inclusive, trabalhos com hortaliças convencionais conhecidas tais como a batata doce e o rabanete. Outros exemplos de plantas seriam a alfafa, centeio, cevada, girassol, nabo forrageiro, sorgo, trigo, dentre outros (NARWAL, 1999).

Existem bastantes trabalhos com herbicidas convencionais utilizados para eliminar uma hortaliça não convencional muito comum em solos brasileiros que é o amaranto. Porém, existem pesquisas que procuram mostrar o outro lado do uso do amaranto, não como uma planta daninha, mas sim como um possível herbicida. Namdari et al. (2012), pesquisaram o uso de cultivares de feijoeiro com tolerância à atividade alelopática de *A. retroflexus* como forma de reduzir a necessidade de herbicidas no início da estação de aplicação, com controle de ervas daninhas no final da temporada, fornecido pela competitividade da cultura. Assim, a inibição ou estímulo que acontece na alelopatia resulta da interferência isolada ou coletiva nos processos fisiológicos, são por isso, considerados como um recurso para o desenvolvimento de pesticidas naturais (FELIX, 2012). Os efeitos alelopáticos de plantas medicinais sobre sementes de plantas daninhas podem gerar modos alternativos de ação, maior especificidade, e por causarem menos danos ambientais são candidatos para o desenvolvimento de novos modelos de herbicidas.

Bioensaios laboratoriais envolvendo investigações alelopáticas são de grande importância, pois no laboratório, pode-se controlar muitos parâmetros e compostos que, na natureza, interagem simultânea e sequencialmente, além de mudarem constantemente. Essas pesquisas que venham a comprovar a atuação da alelopatia em laboratório, são utilizadas por meio de testes de germinação. No entanto, para ter a confirmação de que o potencial alelopático observado é expresso em condições naturais são necessários estudos de campo (TUR; BORELLA; PASTORINI, 2010).

2.2.2 Metabólitos secundários e ação dos aleloquímicos em plantas

Os metabólitos secundários podem ser chamados de compostos ou moléculas bioativas ou alelopáticas, e podem exercer função de reconhecimento, defesa ou inibição de outras substâncias tóxicas. Esses compostos alelopáticos podem ser encontrados em várias classes de produtos naturais, incluindo ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, saponinas e taninos.

A ação visível sobre as plantas inibindo ou estimulando o crescimento ou até mesmo a germinação são respostas secundárias de efeitos primários que ocorrem no processo metabólico das plantas afetadas. Alguns dos processos visíveis podem ser na porcentagem de germinação das sementes que estão sendo avaliadas, interferindo, conseqüentemente, no crescimento inicial das plântulas. Conforme Tur, Borella e Pastorini (2010), existem dois efeitos primários: diretos e indiretos. Entre os efeitos diretos, observam-se interferências no metabolismo vegetal, englobando alterações em nível celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, síntese proteica, metabolismo lipídico e ácidos orgânicos, inibição ou estimulação da atividade enzimática específica, efeitos sobre a relação hídrica e sobre a síntese de DNA ou RNA nas plantas-alvo. Efeitos indiretos compreendem interferência na produtividade das plantas, dos agroecossistemas e na biodiversidade local, por causar alterações na sucessão vegetal, na estrutura e composição das comunidades vegetais e na dominância de certas espécies vegetais.

A toxicidade presente nas plantas deriva-se de componentes químicos secundários chamados de princípios ativos, são eles os alcaloides, os glicosídeos cardioativos ou cardiotônicos, os glicosídeos cianogênicos, os taninos, as saponinas, as toxialbuminas, dentre outros (SIMÕES et al., 2007). Os aleloquímicos são resultantes do metabolismo secundário, produzidos durante todo o ciclo de vida da planta. Essas substâncias estão presentes em todos os órgãos como folhas, flores, frutos, raízes, caules e sementes (GUSMAN; VIEIRA; VESTENA, 2012). Sua produção nos vegetais pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles, temperatura, umidade, índice de precipitação, radiação e variação sazonal (VIECELLI; CRUZ-SILVA, 2009).

De acordo com Silveira (2010), a liberação dos aleloquímicos se dá por diferentes formas como volatilização, exsudação radicular, lixiviação e decomposição de resíduos. A volatilização acontece quando compostos voláteis como terpenos, por exemplo, são volatilizados das folhas, flores, caules e raízes podendo assim ser absorvidos por outras plantas. A lixiviação pode ser definida como a remoção de substâncias químicas das plantas

pela ação da água por meio da chuva, orvalho ou neblina e pode-se citar, por exemplo, compostos como terpenóides e alcalóides.

Outro método é a exsudação radicular, no qual muitos compostos alelopáticos são liberados na rizosfera e podem atuar direta ou indiretamente nas interações planta/planta e na ação de microrganismos, entre estes compostos, podem ser citados a amidalina e a cumarina. A decomposição de resíduos acontece quando toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microrganismos, os quais liberam compostos como os glicosídeos cianogênicos, ácidos fenólicos e flavonoides (FELIX, 2012; SANTOS, 2012). Os terpenos podem ser considerados como a maior classe de metabólitos secundários existentes nas plantas. Sua síntese ocorre a partir de acetil CoA ou de moléculas glicosídicas como o piruvato. Exemplos de terpenos são as giberilinas, os esteroides de membrana celular, os carotenoides e o ácido abscísico.

Os compostos fenólicos possuem um anel aromático com um grupo hidroxila ligado. Sua síntese ocorre a partir da fenilalanina ou acetil CoA. Entre os compostos fenólicos mais importantes estão os derivados de ácido benzoico, ácido cafeico e outros fenilpropanóides simples como cumarinas, ligninas, taninos e flavonoides, este último compreende a maior classe de compostos fenólicos existentes. Nos compostos nitrogenados os principais compostos são os alcaloides, os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos e os aminoácidos não proteicos (NOVAES, 2011).

Diante da enorme diversidade de compostos químicos produzidos pelas plantas, a alelopatia pode contribuir no estudo do processo desses compostos, pois pesquisas têm demonstrado que eles podem ser produzidos em grande quantidade pelas plantas quando essas são submetidas ao estresse biótico ou abiótico (CHAVES; ESCUDERO, 1999).

Os alcaloides, por exemplo, são moléculas caracterizadas pelo baixo peso molecular e pela origem a partir de fenilalanina, tirosina, triptofano e lisina (INDERJIT, 1996; INDERJIT; VIVANCO, 2006; PUTNAM, 1988). De acordo com Rice (1984), vários alcaloides são capazes de inibir o crescimento de bactérias, além de serem tóxicos para alguns invertebrados.

As cumarinas representam uma grande classe de compostos fenólicos encontrados, principalmente, em plantas, mas com ocorrência em fungos e bactérias. Esses constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias (KANEKO; BABA; MATSUO, 2003). O mesmo autor cita que esse é um grupo de compostos com potentes propriedades antioxidantes.

Os depsídeos e as depsidonas são substâncias fenólicas, obtidas a partir de acetil- CoA (HARBORNNE, 1998). Essa via é responsável por produzir o ácido hidroxibenzóico que, ao formar ésteres de duas ou mais subunidades, origina os depsídeos, os precursores para a formação de depsidonas (CARRAZONI, 2003). Segundo Macedo et al. (2007), terapeuticamente esses grupos têm sido reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas.

Referente aos derivados fenólicos, segundo Alves et al. (2004), Carmo, Borges e Takaki (2007) e Inderjit e Duke (2003), são substâncias que atuam na defesa contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores, na proteção contra a radiação ultravioleta e no estabelecimento de simbiose. Os autores citam, ainda, que os derivados fenólicos compreendem o maior grupo de metabólicos que foram identificados como alelopáticos.

Os flavonoides estão presentes nas plantas em diversas formas e com variadas funções. Incluem flavonoides, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, proantocianinas, isoflavonoides, entre outros. Essas substâncias apresentam efeitos alelopáticos, e são capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (RICE, 1984; SAKIHAMA et al., 2002; SHIMOJI; YAMASAKI, 2005).

As saponinas podem ser formadas por triterpenoides glicosilados com cadeia polissacarídica hidrofílica ou por esteroides hidrofóbicos, característica que lhes confere a propriedade detergente. São conhecidas por suas propriedades hemolíticas e toxidez para moluscos, insetos e fungos (KOKATE; PUROHIT; GOKHALE, 2003; RIZVI; RIZVI, 1992).

Os taninos possuem a capacidade de se ligar às proteínas, geralmente de forma irreversível, formando precipitados. Essas substâncias estão envolvidas no papel de proteger a planta contra ataques de herbívoros invertebrados e vertebrados, pois têm como características o sabor adstringente e de difícil digestão, já que as enzimas digestivas não conseguem metabolizar esses precipitados (CÂNDIDO, 2007; SILVA, 2007). Os terpenóides, também chamados isoprenóides, são caracterizados estruturalmente como substâncias constituídas de unidades de isoprenos, unidas em cadeias poliméricas lineares, cíclicas, bicíclicas ou tricíclicas, que, por sua vez, podem possuir funções oxigenadas como álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas (CARDOSO et al., 2001). Eles atuam como reguladores de crescimento, fitoalexinas e repelentes para insetos herbívoros (INDERJIT; DUKE, 2003; MAIRESSE; FARIAS; FIORIN, 2007; ORTEGA et al., 2001).

2.3 A citogenética na agricultura

Segundo Brammer, Zanotto e Caverzan (2007) e Guerra (1988), desde a época de Mendel, a citologia e a genética passaram a colocar seus conhecimentos numa área comum, mais tarde denominada citogenética. A partir disso, a citogenética expandiu-se enormemente, inserindo-se em vários outros campos da biologia, como a taxonomia, a bioquímica, a medicina clínica e o melhoramento animal e vegetal. Por ser a citogenética o estudo da genética por meio da citologia, essa área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (BRAMMER; ZANOTTO; CAVERZAN, 2007).

Com a expansão das pesquisas citogenéticas, atualmente, é dada grande importância a estudos que identifiquem plantas com atividade alelopática com potencial para que se criem alternativas naturais para o controle de pragas, criando herbicidas naturais com menor impacto no ambiente (KATO-NOGUCHI et al., 2013).

Estudos prospectivos para esse fim são realizados a partir da identificação da atividade alelopática da espécie vegetal de interesse. Como essa atividade está relacionada com a ação que uma planta exerce sobre o crescimento e desenvolvimento de outra (RICE, 1979), realizam ensaios a fim de prospectar a fitotoxicidade do extrato da planta de interesse em uma espécie modelo.

Em geral, tal abordagem é realizada por meio de ensaios de germinação e crescimento radicular (PAWLOWSKI et al., 2012) em *Lactuca sativa* L. (TIGRE et al., 2012). O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010).

Na última década, tem-se relacionado análises citogenéticas a estes testes de fitotoxicidade, dando evidências sobre os mecanismos de ação do extrato (ARAGÃO et al., 2015; LUBER et al., 2015). Além dos dados de percentual de germinação e alongação radicular, outro parâmetro importante que é possível determinar com base no ensaio de crescimento radicular é o IC_{50} (Inibição de Crescimento 50%), o qual corresponde à concentração do agente testado em que o tamanho das raízes do modelo vegetal é 50% menor que o das raízes do tratamento controle (SADHNA; HARDEEP; KHULLER, 2001). Do ponto de vista citogenético essa concentração é altamente representativa, pois refletirá, com clareza, os efeitos tóxicos do agente testado sem que a inibição seja demais, o que resultaria

em raízes muito frágeis e/ou pequenas demais para a montagem de lâminas para avaliação de ciclo celular.

Várias estratégias têm sido utilizadas em plantas para a detecção de citogenotoxicidade. Entre as mais comuns está a análise de parâmetros citogenéticos (microscópicos), tais como, (1) índice mitótico (IM), calculado como a frequência de células em divisão; (2) percentuais de alterações cromossômicas (AC) numéricas ou estruturais, expresso pelo número de alterações – c-metáfases, cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos perdidos – dividido pelo total de células e (3) aberrações nucleares (AN), determinadas pela frequência de núcleos condensados, lobados e células poli ou micronucleadas em intérfase (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). De modo geral, os percentuais de células em divisão (IM) e as AC ou AN são calculados como uma resposta às dosagens ou tratamentos diferenciados e permitem definir se a substância ou composto avaliado é genotóxico (AC), citotóxico (IM, AC e AN) ou mutagênico (AN) (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A espécie modelo *L. sativa* L. (alface) se destaca para ensaios de germinação e crescimento, pois possui uma germinação uniforme e rápida, além dos ensaios serem concluídos com apenas 120h de exposição (TORRES RODRÍGUEZ, 2003), o que permite obter dados sem atrasos indevidos (DAYAN; DUKE, 2006). Adicionalmente, é importante que as análises citogenéticas sejam feitas por meio de um bioensaio capaz de avaliar misturas complexas, visto que as interações alelopáticas geralmente se dão por vários compostos que agem de forma antagonista e/ou sinérgica entre si (REIGOSA et al., 2013).

A alface, como vegetal superior, cumpre essa exigência (GRANT, 1994) além de se destacar por possuir uma boa sensibilidade e ser eficiente para a análise dos parâmetros citogenéticos (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014), o que a torna uma espécie modelo eficiente tanto para as análises macroscópicas quanto microscópicas.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo das hortaliças não-convencionais, principalmente por agricultores familiares e agricultores urbanos pode proporcionar o enriquecimento da dieta alimentar local com a diversificação da produção, além de algumas das hortaliças não-convencionais representarem significativa oportunidade de renda, seja in natura ou com seus subprodutos, semelhante às hortaliças convencionais.

Essas hortaliças são espécies importantes socioculturalmente para o nosso país por mais que venham a apresentar distribuição limitada e restrita a determinadas localidades ou regiões, exercendo influência na alimentação e na cultura das populações locais. Por esse motivo, estudos e pesquisas fitotécnicas, químicas e citogenéticas devem ser desenvolvidos como forma de suprir a escassez de informações, haja vista o reduzido volume literário sobre várias dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 143-152, Apr. 2013.
- ALMEIDA, G. D. et al. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Faculdade Nacional de Agronomia**, Medellín, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ALVES, C. C. F. et al. Atividade Alelopática de Alcalóides Glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 1, p. 53-59, 2003.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 1083-1086, 2004.
- ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, *Leguminosae mimosoideae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, p. 231-235, 2007.
- ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J.; DAVIDE, L. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 71, p. 706-710, 2008.
- 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*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**, Haryana, v. 35, n. 2, p. 259-272, Apr. 2015.
- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.
- ASOCIACIÓN MEXICANA DEL AMARANTO. **Importancia del amaranto**. México, 2003. Disponível em: <<http://www.amaranta.com.mx/elamaranto/importancia/importancia>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- ASSIAK, I. E. et al. Preliminary studies on the effects of *Amaranthus spinosus* leaf extract as an Anthelmintic in growing pigs. **Tropical Veteriarian**, Ibadan, v. 20, p. 126-129, 2002.

- BALESTRIN, L. et al. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (*Moraceae*) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 230-235, 2008.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.
- BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 67-75, 2009.
- BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2007. 9 p. (Documentos on line. Embrapa Trigo).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hortaliças não-convencionais: (tradicionalis)**. Brasília, DF, 2010. 52 p.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, jul. 2010.
- BUNCE, J. et al. The world's worst weeds. **International Pest Control**, Beijing, v. 44, p. 55-58, 2002.
- CÂNDIDO, A. C. da S. **Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (*Leguminosae, Caesalpinioideae*): bioensaios em laboratório e casa de vegetação**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: Ed. UFLA, 2001. v. 1, 81 p.
- CARMO, F. M. S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Allelopathy of Brazilian sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer aqueous extracts. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, p. 697-705, 2007.
- CARRAZONI, E. D. Estudo químico de líquens VIII: isolamento dos constituintes da *Cladonia sprucey*. **Revista Química e Tecnologia**, Recife, n. 1, p. 32-34, 2003.
- CARVALHO, M. S. S. et al. Phytochemical screening, extraction of essential oils and antioxidant activity of five species of unconventional vegetables. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 6, p. 2632-2639, Oct. 2015.
- CHAVES, N.; ESCUDERO, C. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: INDERJIT, D. K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 267-285.
- CHEEKE, P. R.; BRONSON, J. Feeding trials with *Amaranthus* Grain, forage and leaf protein concentrates. In: AMARANTH CONFERENCE, 2., 1980, Emmaus. **Proceedings...** Emmaus: Rodale Press, 1980. p. 5-11.

- COSTA, D. M. A. **Impactos do estresse salino e da cobertura morta nas características químicas do solo e no desenvolvimento do amaranto**. 2007. 124 p. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- COSTA, D. M. A.; DANTAS, J. A. Efeitos do substrato na germinação de sementes de amaranto (*Amaranthus spp*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 498-504, 2009.
- COSTA, D. M. A. et al. Conteúdo de N, P, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ no amaranto (*Amaranthus spp*) sob estresse salino e cobertura morta. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 209-216, 2008.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009. 1200 p.
- DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L.; INDERJIT, D. K. M. M. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In: INDERJIT, D. K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 3-14.
- DANA, E.; SANZ-ELORZA, M.; SOBRINO, E. **Plant invaders in Spain (check-list): the unwanted citizens**. 2003. Disponível em: <<http://www.med-alienplants.org/checklist>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: _____. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 63-83.
- DE LA CRUZ, M. **Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis**. México: Fondo de Cultura Económica; Instituto Mexicano del Seguro Social, 1991.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.
- DIAS, J. F. G. et al. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., *Celastraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.
- EVGENY, N. *Amaranth*: perspective raw material for foodprocessing and pharmaceutical industry. **Chemical Computer Simulation**, Kazan, v. 2, p. 5-16, 2001.
- EYZAGUIRRE, P. B.; PADULOSI, S.; HODGKIN, T. IPGRI's strategy for neglected and underutilized species and the human dimension of agrobiodiversity. In: PADULOSI, S. (Ed.). **Prioritysetting for underutilized and neglected plant species of the Mediterranean region**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1999.

FELIX, R. A. Z. **Efeito alelopático de extratos de *Amburana cearensis* (fr. all.) A.C. Smith sobre a germinação e emergência de plântulas.** 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 197, p. 243-260, 1988.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GETAHUN, A. **Some common medicinal and poisonous plants used in Ethiopian folk medicine.** 1976. Disponível em: <<http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2016/pdf/biblio-hg-07-getahun.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GIRIJA, K.; LAKSHMAN, K. Antihyperlipidemic activity of metanol extracts of three plants of *Amaranthus* in triton-WR 1339 induced hyperlipidemic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Beijing, v. 1, p. s62-s65, 2011.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research Regular Papers**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRUBBEN, G. J. H.; DENTON, O. A. (Ed.). **Plant resources of tropical Africa 2: vegetables.** Wageningen: PROTA Foundation, 2004. 447 p.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 4, n. 25, p. 37-48, 2012.

HARBORNNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.** 3rd ed. London: Chapman & Hall, 1998. 302 p.

HUSSAIN, Z. et al. Anti diarrheal and anti ulcer effect of *Amaranthus spinosus* Linn. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, p. 932-939, 2009.

INDERJIT, C. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review**, Bronx, v. 62, p. 186-197, 1996.

INDERJIT, C.; DEL MORAL, R. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **The Botanical Review**, New York, v. 63, n. 3, p. 221-230, 1997.

INDERJIT, C.; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Plant**, v. 217, p. 529-539, 2003.

- INDERJIT, C. H. H.; NISHIMURA, H. Plant phenolics and terpenoids: transformation, degradation, and potential for allelopathic interactions. In: INDERJIT, D. K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 255-266.
- INDERJIT, C. R. M.; VIVANCO, J. M. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 574-580, 2006.
- INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Strategic framework for underutilized plant species research and development**. Sri Lanka: Global Facilitation Unit for Underutilized Species, 2006. 40 p.
- IZCO, J. et al. **Botánica**. Madrid: McGraw Hill Interamericana, 2004. 920 p.
- KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 142, p. 239-254, 2003.
- KATO-NOGUCHI, H. et al. A novel substance with allelopathic activity in Ginkgo biloba. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 18, p. 1595-1599, 2013.
- KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Riqueza de plantas alimentícias não convencionais na região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 63-65, jul. 2007. Suplemento 1.
- KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 768 p.
- KLEIN, K.; BLUM, U. Effect of soil nitrogen level on ferulic acid inhibition of cucumber leaf expansion. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n. 8, p. 1371-1383, 1990.
- KOKATE, C. K.; PUROHIT, A. P.; GOKHALE, S. B. **Analytical pharmacognosy**. 23rd ed. Nirali Prakashan: Pune, 2003. 112 p.
- LAMBDOM, P. et al. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. **PRESCIA**, Southampton, v. 80, p. 101-149, 2008.
- LEME, D. M.; ANGELIS, D. de F. de; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**. Reviews in Mutation Research, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- LEVY-COSTA, R. B.; SICHIERI, R.; MONTEIRO, C. A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 530-40, 2005.

LUBER, J. et al. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Lactuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 903-913, abr./maio 2015.

MACEDO, F. M. et al. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1166-1168, 2007.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 1, p. 1-19, Apr. 2008.

MAIRESSE, L. A. S. E. C. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, Porto Alegre, v. 14, p. 1-12, 2007.

MANO, A. R. O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MAULI, M. M. et al. Alelopatia de Leucena sobre soja e plantas invasoras. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-62, 2009.

MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças. In: REUNIÃO ORDINÁRIA DA CÂMARA SETORIAL DA CADEIA, 13., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Produtiva de Hortaliças; MAPA, 2007. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/downloads/cadeia_produtiva.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2016.

MILLIOLI, V. S. et al. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolípido quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 4., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_ABS_6_2_0387-1.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2016.

MORALES, E.; LEMBCKE, J.; GRAHAM, B. Nutritional value for young children of grain Amaranth and Maize-Amaranth mixtures effect of processing. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 118, p. 78-85, 1988.

MWANGI, D. **Introduction to Amaranth**. 2nd ed. Nairobi: Joypet Services, 2003. 56 p.

NAMDARI, T. et al. Allelopathic effects of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) root exudates on common bean seedling growth. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, Rennes, v. 3, n. 6, p. 1230-1234, 2012.

NARWAL, S. S. Allelopathy in weed management. In: _____. **Allelopathy update: basic and applied aspects**. Enfield: Science, 1999. v. 2, p. 203-254.

- NOVAES, P. **Alelopatia e bioprospecção em *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata***. 2011. 112 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- OMAMI, E. N. **Response of amaranth to salinity stress**. 2005. 255 p. Thesis (Ph.D. in Plant Production and Soils Science)-Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria, 2005.
- ORTEGA, A. et al. Methyl dodonates, a new type of diterpenes with a modified clerodane skeleton from *Dodonaea viscosa*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 57, p. 2981-2989, 2001.
- PAWLOWSKI, Â. et al. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (*Anacardiaceae*): mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 80, p. 96-103, May 2012.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- POND, W. G.; LEHMANN, I. W. Nutritive value of a vegetable *Amaranth* cultivar for growing lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 3036-3039, 1989.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.
- PUTNAM, A. R. Allelochemicals from plants as herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v. 2, p. 510-518, 1988.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.
- REYAD-UL-FERDOUS, M. D. et al. Present biological status of potential medicinal plant of *Amaranthus viridis*: a comprehensive review. **American Journal of Clinical and Experimental Medicine**, New York, v. 3, n. 5, p. 12-17, 2015. Special issue.
- RIBEIRO, P. A. et al. Ora-pro-nóbis: cultivo e uso como alimento humano. **Revista em Extensão**, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 70-81, 2014.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd ed. Orlando: Academic, 1984. 422 p.
- RICE, E. L. Allelopathy: an update. **The Botanical Review**, Bronx, v. 45, n. 1, p. 15-109, 1979.
- RIZVI, S. G. H.; RIZVI, V. **Allelopathy**: basic and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1992. 480 p.

ROCHA, D. R. C. et al. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2008.

ROTENBERG, S. et al. Oficinas culinárias na promoção da saúde. In: DIEZ-GARCIA, R. W.; CERVATOMANCUSO, A. M. (Coord.). **Mudanças alimentares e educação nutricional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 327-334.

SADHNA, S.; HARDEEP, K.; KHULLER, G. K. Cell cycle effects of the phenothiazines: Trifluoperazine and chlorpromazine in *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 199, p. 185-190, 2001.

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, Limerick, v. 177, p. 67-80, 2002.

SAMARTINI, C. Q. **Conteúdo de DNA, número cromossômico e alguns compostos de interesse nutricional em *Amaranthus spp.*** 2015. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SAMARTINI, C. Q. et al. Número cromossômico e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Amaranthus* (*Amaranthaceae*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 51, n. 8, p. 998-1001, ago. 2016.

SAMUEL, A. **The chemistry and technology of cereals as food and feed**. 2nd ed. New York: Springer, 1991. 751 p.

SANGAMESWARAN, B.; JAYAKAR, B. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and spermatogenic effects of *Amaranthus spinosus* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Natural Medicines**, New York, v. 62, p. 79-82, 2008.

SANTIAGO, J. A. **Óleos essenciais de três espécies de *myrtaceae*: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotóxica e citogenotóxica**. 2015. 222 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SANTOS, V. H. M. **Potencial alelopático de extratos e frações de *Neea theifera* Oerst. (*Nyctaginaceae*) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa***. 2012. 251 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Ecofisiologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

SHIMOJI, H.; YAMASAKI, H. Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, p. 117-119, 2005.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. 2015. 167 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SILVA, L. F. L. **Hortaliças não convencionais: quantificação de DNA, contagem cromossômica, caracterização nutricional e fitotécnica na UFLA e Avaliação do potencial nutricional das espécies**. 2015. 141 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SILVA, W. A. **Potencial alelopático de extratos do cumaru (*Amburana cearenses* A.C. Smith) e da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir) na germinação e crescimento do sorgo (*Sorghum bicolor* L.), milho (*Zea mays* L) e feijão guandu (*Cajanus cajan* L.).** 2007. 62 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvipastoril)-Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2007.

SILVEIRA, P. F. **Efeito alelopático do extrato aquoso da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).** 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. 1102 p.

SINGH, B. P.; WHITEHEAD, W. F. Population density and soil pH effects on vegetable amaranth production. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **New crops.** New York: Wiley, 1993. p. 562-564.

SOUZA, K. K. C. **Potencial antioxidante, mineral inibitório de enzimas alfa amilase e lipooxigenase e composição centesimal de espécies da família *apiaceae*.** 2016. 103 p. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SOUZA, M. R. M. et al. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 4, p. 3550-3554, 2009.

SPHEAR, C. R. **Amaranto: opção para diversificar a agricultura e os alimentos.** Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2007. 136 p.

SRAVAN, P. M. et al. Effects of anti-inflammatory activity of *Amaranthus viridis* Linn. **Scholars Research Library Annals of Biological Research**, Gurgaon, v. 2, n. 4, p. 435-438, 2011.

SURSE, S. N. et al. Celosia cristata: potent pharmacotherapeutic Herb: a review. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, Pnachkula, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2014.

TEUTONICO, R.; KNORR, D. Amaranth: composition, properties and applications of rediscovered food crop. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 39, p. 49-60, 1985.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 84, p. 125-132, Oct. 2012.

TORRES, A. et al. Introduction, a science for the future. In: WORLD CONGRESS ON ALLELOPATHY, 1., 1996, Cádiz. **Proceedings...** Cádiz, 1996. p. 16-20.

TORRES, S. B. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz da alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, nov. 2004.

TORRES RODRÍGUEZ, M. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, Ciudad de la Habana, v. 41, n. 2/3, dic. 2003. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032003000200009>. Acesso em: 10 mar. 2016.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 2, n. 23, p. 13-22, 2010.

VIECELLI, C. A.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 39-46, 2009.

VILLARÍAS, J. **Atlas de Malas Hierbas**. Madrid: Mundi, 2006. 632 p.

WEIDENHAMER, J. D.; HARTNETT, D. C.; ROMEO, J. T. Density dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 26, p. 613-624, 1989.

WILLINAMS, J.; BRENNER, D. Grain Amaranth (*Amaranthus* species). In: WILLIMAS, J. T. (Ed.). **Underutilized crops: cereals and pseudo cereals**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 129-187.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - PHYTOCHEMICAL SCREENING, EXTRACTION OF ESSENTIAL
OILS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FIVE SPECIES OF
UNCONVENTIONAL VEGETABLES**

**Artigo formatado de acordo com a norma
do periódico American Journal Of Plant Sciences
PUBLICADO EM OUTUBRO DE 2015.**

ABSTRACT

Unconventional vegetables, in general, are plants that have been largely consumed by the population at some point and, because of changes in eating behavior, now present reduced economic and social expression and have lost ground to other vegetables. The objectives of this study were to perform phytochemical screening of the ethanol extracts of *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum*, *Stachys byzantina* K. Koch and *Solanum betaceum* Cav. and evaluate their antioxidant potentials via the methods involving scavaging of the DPPH free radical and the ABTS radical, phosphomolybdenum and reducing power. In phytochemical screening, five species of unconventional vegetables tested positive for tannins; for sesquiterpene, lactones and other lactones. These tests were positive for *Tropaeolum majus* L. and *Rumex acetosa* L., *Solanum betaceum* Cav. and *Solanum muricatum* tested negative for steroids. Only *Solanum betaceum* Cav. gave positive tests for flavonoids. Among the five plant species studied, *Stachys byzantina* K. Koch presented the greatest antioxidant potential in all the methods evaluated.

Keywords *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Stachys byzantina* K. Koch, Reducing Power

1. INTRODUCTION

Unconventional vegetables are considered to be those that are currently consumed by only a few people, usually in restricted areas or communities. These vegetables have a good taste and nutritional value [1]. Because of globalization and the increasing use of processed foods, cultivation and consumption of unconventional vegetables have decreased in all the regions of Brazil, both urban and rural areas. As a result, the eating habits of Brazilians of all social classes are being modified, and the consumption of food from local and regional sources has been shrinking [2].

Tropical and subtropical countries have the greatest diversity of vascular plant species. However, the number of indigenous fruits and vegetables utilized are negligible. With respect to native vegetables, research, cultivation, use and valorization seem to be even less [3].

Among these vegetables, some stand out in Brazilian cuisine. In southeastern Brazil, more specifically in the state of Minas Gerais, there is *Rumex acetosa* L. (sorrel), which is a herbaceous perennial native to Europe and North Asia (Eurasia), including being considered a “weed” in that continent. It presents sour leaves and is used in raw salads (pure or mixed, providing freshness) or as a vegetable in soups, puree or green sauce and omelets[4].

Another widely used unconventional vegetable is *Tropaeolum majus* (nasturtium). It is an annual, herbaceous plant native to the highlands of Mexico and Peru. It is widely cultivated for ornamental purposes and for consumption in most regions of Brazil. Its flowers and young leaves can be used to prepare raw salads, green pasta, pancakes, pizzas, breads and soups, and it can be cooked with meat, among other uses. The *Stachys byzantina* K. Koch (peixinho; “little fish”) species, also known as peixinho-do-jardim, is a herbaceous perennial vegetable native to Turkey, Asia and Caucasus. It is widely cultivated in southern and southeastern Brazil for ornamental purposes in sites with strong sunlight and for consumption as a vegetable. Its leaves can be eaten after cooking and suitable culinary preparation. It has a light texture and fried-fish flavor, hence some of the popular names: peixinho, peixinho-da-horta or lambari-da-horta (“little fish”, “little-fish-of-the-garden” or “tetra-of-the-garden”) [4]. *Solanum muricatum* (melãozinho; “little melon”) is an evergreen shrub with fruits 10 to 15 cm long. It is a plant of the *Solanaceae* family. It has a sweet flavor and aroma similar to melon (hence the name, despite not being closely related). *Solanum betaceum* (tomate da arvore; “tree tomato”) of the *Solanaceae* family is an erect shrub, sublenhose, perennial, sparsely branched, 2.5 to 4.5 m high and native to Bolivia and Peru. The fruit can be consumed fresh. It has a yellow juicy pulp with a slightly sour flavor and many seeds [4].

Unconventional vegetables are not usually organized in the supply chain itself and do not arouse interest from seed, fertilizer or pesticide companies. However, the work of rescuing these plants from the point of view of increasing their use in food and research represents a cultural, social and economic gain and may stimulate the production and consumption of these foods because of their possible nutritional and pharmaceutical characteristics, in addition to their hardiness in cultivation.

Considering the hardiness to cultivation and desirable nutritional characteristics, the determination of the chemical composition of these species by means of a preliminary survey that can predict the groups of secondary metabolites in the extract is important. Some research has shown that certain compounds present in plant extracts can have antioxidant action, and they are indicated to reduce or prevent the deleterious effects of cellular oxidative stress [5] [6]. There is a growing interest in finding plant species that can act in the fight against free radicals. The objectives of this study were to evaluate the antioxidant potential using the methods of sequestration of the DPPH free radical or the ABTS radical, phosphomolybdate and reducing power and to perform phytochemical screening of *Rumex acetosa* L. (sorrel), *Tropaeolum majus* L. (capuchin), *Solanum muricatum* (little melon), *Stachys byzantina* K. Koch (little fish) and *Solanum betaceum* Cav. (tree tomato).

2. Material and Methods

2.1. Collection and Extraction of Plant Material

The leaves and fruits of unconventional vegetables (considered to be those that are currently consumed by only a few people, usually in restricted areas or communities) were obtained from the collection of the Department of Agriculture of the Federal University of Lavras. Samples of *Rumex acetosa* L. (sorrel), *Tropaeolum majus* L. (capuchin), *Solanum muricatum* (little melon), *Stachys byzantina* K. Koch (little fish) and *Solanum betaceum* Cav. (tree tomato) were sent to the Organic Chemistry Laboratory–Essential oils of the Department of Chemistry of the same University. The collected material (leaves or fruits) was dried in an oven (35°C) for 72 hours. To 100 mL of ethanol was added 50 g of the plant, and the mixture was heated under reflux for 8 hours. The mixture was filtered through a Buchner funnel, and the ethanol was evaporated on a Büchi B114 rotary evaporator to furnish the plant extract.

2.2. Phytochemical Screening

The presence of the major classes of metabolites was determined according to the method proposed by Matos (1988) [7]. To test for tannins, a few milligrams of extract was dissolved in 3 mL of distilled water and a drop of 1% ferric chloride was added. A change in color or formation of a precipitate indicated a positive reaction. To test for the presence of flavonoids, a few milligrams of extract was dissolved in 10 mL of methanol. If necessary, the mixture was filtered, and five drops of concentrated HCl and a one-cm piece of magnesium tape were added. A pink tint in the solution indicated a positive reaction. For these and all other tests, 1 mg of each extract of leaves was used. Tests were performed for organic acids, reducing sugars, polysaccharides, proteins and amino acids, tannins, catechins, flavonoids, cardiac glycosides, sesquiterpene, lactones and other lactones, azulenes, carotenoids, steroids, depsides, coumarin derivatives, saponins, alkaloids, purines and anthraquinones.

2.3. Essential Oils

To obtain the essential oils, 200 g of edible fruits or leaves was subjected to hydrodistillation for 2 hours, using a modified Clevenger apparatus to furnish the hydrolac [8]. The essential oil was separated from the distillate by centrifugation on a benchtop centrifuge with a horizontal crosspiece (Fanem Model 206 Baby®I BL) at 965.36 g for 5 minutes or by partition with dichloromethane. No essential oil was obtained from any of the plants studied.

2.4. Antioxidant Activity

2.4.1. ABTS Method

The antioxidant activity by the ABTS^{•+} method [ammonium salt of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzenethiazoline-6- sulfonic acid)] was performed according to the method described by Guerreiro et al. (2013) [9]. The ABTS radical was formed by the reaction of 7 mM ABTS^{•+} solution with 2.4 mM potassium persulphate, incubated at 25°C in the dark for 12 - 16 hours. Once formed, the PA radical was diluted with ethanol to obtain the absorbance (from 0.7 to 0.72) at 734 nm. In a dark environment, 50 µL of each of the samples (concentrations 31.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg·mL⁻¹) was transferred to test tubes containing 1950 µL of the ABTS^{•+} radical. The percentage inhibition of the ABTS^{•+} radical by the samples was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Effect on radical capture} = [(A_{CN} - A_{SAM}) / A_{CN}] \times 100$$

Where:

A_{CN} = Absorbance of the negative control;

A_{sam} = Absorbance of the sample;

The values were compared with those of the BHT (butyl hydroxy toluene) standard at concentrations of 31.25; 62.5; 125; 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.4.2. Sequestration of the DPPH Free Radical

Evaluation of antioxidant activity by means of the capture of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical was performed according to a modification of the method of Lutz-Lopes et al. (2008) [10]. A metanol solution of DPPH was prepared at a concentration of 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. To each test tube was added 2.7 ml of the DPPH solution, followed by 0.3 mL of each extract dissolved in ethanol at concentrations of 31.25; 62.5; 125; 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The BHT standard was used as a positive control. The negative control was a solution containing all the reagents except the extracts. After standing for 60 minutes in the dark, absorbance readings were taken at 515 nm (Shimadzu UV-160 1PC). The antioxidant activity (AA%) was calculated from the following equation:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{SAM}) / A_{CN}] \times 100$$

where:

A_{CN} = Absorbance of the negative control;

A_{sam} = Absorbance of the sample.

2.4.3. Phosphomolybdate

To a test tube containing 1 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 Mm ammonium molybdate) was added an aliquot of 0.1 ml of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of extract in ethanol. The blank contained 1 mL of the reagent solution and 0.1 mL of ethanol. The tubes were capped and incubated in a water bath at 95°C for 60 minutes. After cooling, the test tubes were read at 695 nm. The values for the antioxidant activity of the extracts were compared with a curve obtained with various concentrations of BHT (31.25,

62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and the results were expressed in mg equivalents of BHT per mg of extract [11].

2.4.4.Reducing Power

To a test tube were added a 0.1 mL aliquot of a solution of plant extract with 1 mL of phosphate buffer solution (pH = 7.4) and 1.0 mL of 1% potassium ferricyanide. After incubation at 50°C for 30 minutes, 0.5 mL of 10% trichloroacetic acid, 1.5 mL of distilled water and 0.3 mL of ferric chloride were added, and the absorbance was measured at 700 nm. The antioxidant activity of the extracts were compared with a standard curve for various concentrations of BHT (31.25, 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Results were expressed in equivalent mg BHT per mg of extract [12].

2.5. Statistical Analysis

Analysis of variance was performed for the ABTS and DPPH tests, followed by the F test, to verify the effect of concentration on the antioxidant activity. For both tests, a completely randomized design (CRD) was used in a 6×5 factorial: six samples and five concentrations of extracts (31.25, 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were analyzed with three replications. Analyses were performed using the Sisvar program [13].

3. Results and Discussion

3.1. Phytochemical Screening

The results of the tests for the classes of compounds in both extracts are presented in Table 1.

All five species of vegetables tested positive for tannins. The tannin identification reaction is based on the formation of a green or blue coloration or precipitate. According to Cunha and Batista (2010) [14], the tannins are generally found in different concentrations in vascularized plants. They may be present in many plant organs such as leaf, fruit and bark; they are soluble in water, alcohols and acetone, and exert a protective function in plants. The test for steroids was positive for *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L. and *Stachys byzantina* K. Koch. The residue from the *Solanum muricatum* extract was not soluble in chloroform, so it was not possible to perform the test with this extract. The test with the S.

betaceum extract was negative. The extracts from *Rumex acetosa* L. and *Tropaeolum majus* L. tested positive for sesquiterpene lactones and other lactones. Tests for flavonoids were negative with the extracts from *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum* and *Stachys byzantina* K. Koch. A positive result was observed for the extract from *Solanum betaceum* Cav. According to Souza et al. (2010) [15], flavonoids have an antioxidant action by reason of their chemical structures and reducing properties.

Table 1. Metabolites whose results were positive in phytochemical screening for ethanol extracts of *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum*, *Stachys byzantina* K. Koch and *Solanum betaceum* Cav.

Compound	<i>Rumex acetosa</i> L.	<i>Stachys byzantina</i> K. Koch	<i>Tropaeolum majus</i> L.	<i>Solanum betaceum</i> Cav.	<i>Solanum muricatum</i>
Tannins	+	+	+	+	+
Steroids	+	+	+	-	-
Sesquiterpene, lactones and other lactones	+	-	+	-	-
Flavonoids	-	-	-	+	-

They are phenolic compounds that have a perfect structure for scavenging free radicals and can be more effective as antioxidants than some vitamins. The antioxidant activity of flavonoids is related to their oxidation power [16]. Suhartono et al. (2012) [17] studied the antioxidant activity and the presence of flavonoids in some medicinal plants (Kelakai, Kasturi, pasak bumi and ferns) and found that all fractions of the plants tested had a high flavonoid content, unlike four of the five species analyzed in this study. Porto et al. (2014) [18] found a high concentration of flavonoids (728.00 mg. 100 g⁻¹) when they analyzed the chemical composition of Jenipapo (*Genipa americana* L.), unlike Barreto, Benassi and Mercadante (2009) [19] who obtained a flavonoid concentration of 73.3 mg. 100 g⁻¹ for buriti (*Mauritia flexuosa*), 103.8 g/mg. 100 g⁻¹ for bacuri (*Platonia insignis* M.), 319.4 mg. 100 g⁻¹ for murici (*Byrsonima crassifolia* L.) and 741.2 mg. 100 g⁻¹ for pequi (*Caryocar brasilia* C.). According to Porto et al. (2014) [18], only the *Caryocar brasilia* C. contained a concentration of flavonoides near that obtained in the previous study, whereas the values for the other plants were well below those recorded in that survey. The remaining phytochemical screening tests with the extracts of these five vegetables were negative.

3.2. Essential Oils

No essential oils were obtained from the five species of non-conventional vegetable surveyed here.

3.3. Antioxidant Activities

The results of evaluation of the antioxidant activity (AA) through the method involving inhibition of the ABTS radical are shown in Figure 1. The percent of AA increased with increasing concentration for all the samples. Thus, the highest percentage of antioxidant activity was obtained at a concentration of $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Among the five species studied, *S. brizantina* presented the greatest activity, and this fact is due to the high concentration of phenolics (tannins) present in the plant. *Solanum muricatum* had the lowest antioxidant potential, and its activities at concentrations of 62.5, 125 and $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were statistically equal. Although tannins were found in that extract, these compounds might be present in lower concentrations or complexed that the hydroxyl hydrogen is unable to react with the ABTS radical (Figure 2).

Results for the antioxidant activity determined by scavaging of the DPPH free radical are shown in Figure 3. The percentages of the antioxidant activity of all the species were similar to those observed with the previous method. There was an increase in the antioxidant activity with increasing concentration of the extract, there by demonstrating a dose-dependent effect (Figure 4).

Results of the tests of the extracts from the five vegetables for antioxidant activity performed by means of the formation of complexes with phosphomolibdenum and by determination of the reducing power were expressed in mg equivalent BHT/mg of plant extract (Table 2). The extracts from *Tropaeolum majus* L. and *Stachys byzantina* K. Koch presented the highest antioxidant activities as measured by formation of the phosphomolibdenum complex. This method is a simple and inexpensive way to measure the total antioxidant capacity of a complex mixture of compounds containing both lipophilic and hydrophilic substances, such as extracts obtained from plants [20].

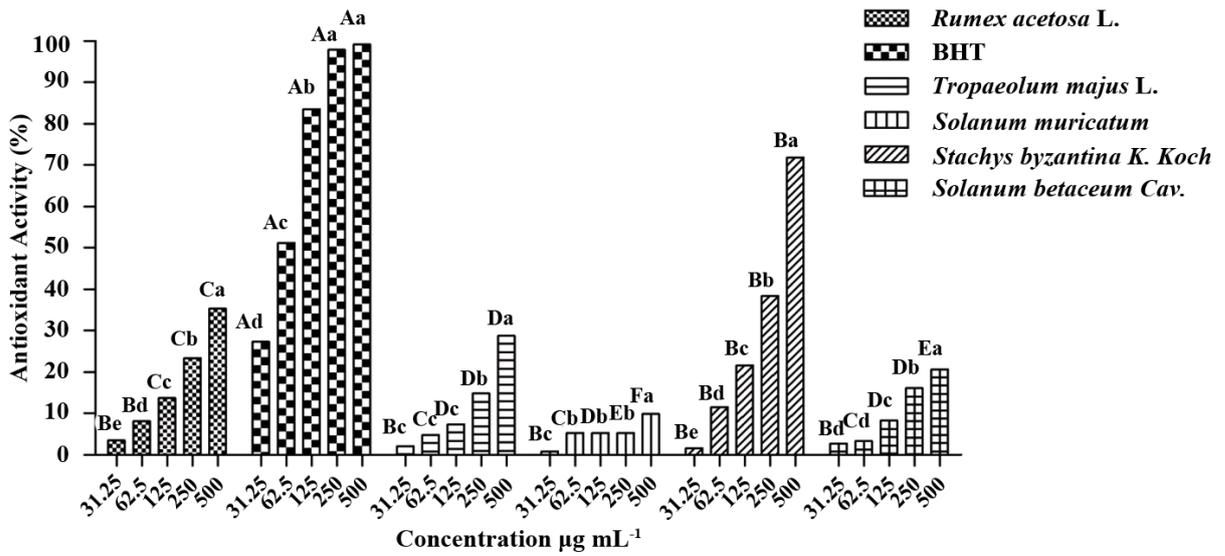


Figure 1. Percentage of the antioxidant activity of plants *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum*, *Stachys byzantina* K. Koch and *Solanum betaceum* Cav. the method of inhibiting the ABTS radical. The means followed by the same letter: in lower case are the comparison of concentrations in each plant and the upper letter of each concentration compared between different plants do not differ significantly at probability of 5%, by Scott-Knott test. *BHT = Butyl hydroxy toluene.

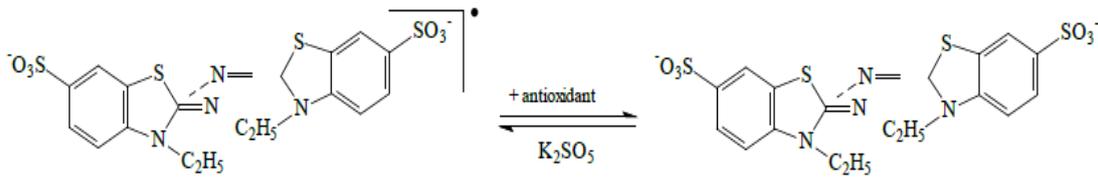


Figure 2. Antioxidant stabilizing ABTS radical and formation of potassium persulfate.

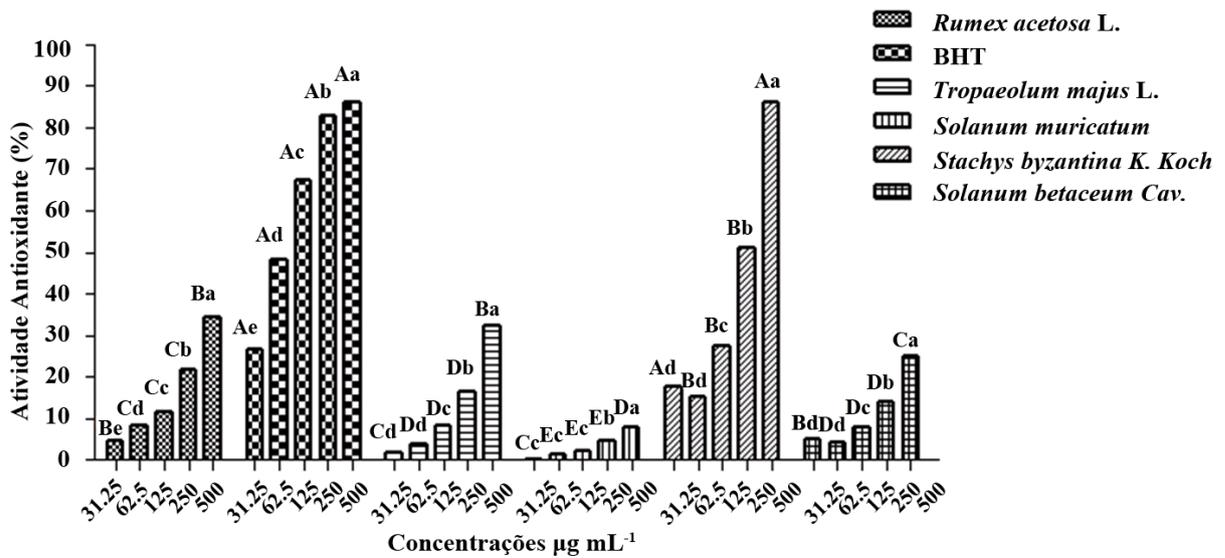


Figure 3. Percentage of the antioxidant activity of plants *Rumex acetosa* L., *Tropaeolum majus* L., *Solanum muricatum*, *Stachys byzantina* K. Koch and *Solanum betaceum* Cav. by DPPH radical inhibition method. The means followed by the same letter: in lower case are the comparison of concentrations in each plant and the upper letter of each concentration compared between different plants do not differ significantly at probability of 5%, by Scott-Knott test. *BHT = Butyl hydroxy toluene.

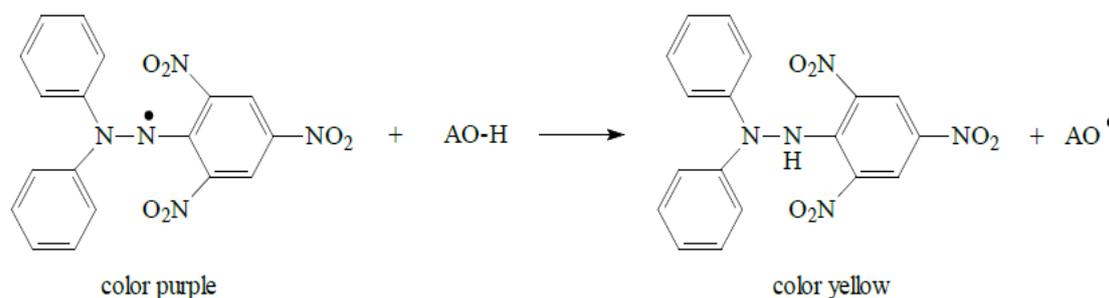


Figure 4. Antioxidant stabilizing DPPH• radical. *AO-H = representation of an antioxidant substance.

The *Stachys byzantina* K. Koch extract presented the highest antioxidant activity by the reducing power method (Table 2). This method is based on the reduction of ferricyanide to ferrocyanide ion in the presence of ferric ion (derived from FeCl_3) (Figure 5) [21].

According Meir et al. (1995) [22], the reducing capacity of a compound may serve as an important indicator of its antioxidant potential. Sudha et al. (2012) [23] found that the reducing power of the ethanol extracts of ripe and unripe exotic cucumbers in concentrations of 0.190; 0.177 to 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.921; 0.672 to 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The values observed in this study were lower than those found by Sudha et al. (2012) [23].



Figure 5. Reduction of ferricyanide ion to ferrocyanide.

Table 2. Antioxidant activity of *Rumex acetosa* L. (sorrel), *Tropaeolum majus* L. (Capuchinha), *Solanum muricatum* (melaozinho), *Stachys byzantina* K. Koch (peixinho) and *Solanum betaceum* Cav. (tree tomato), by phosphomolybdenum complex and the reducing power methods.

Plants	Phosphomolybdenum complex	Reducing power
	mg BHT Equivalent/mg of sample extract	
<i>Rumex acetosa</i> L. (leaf)	0.11	0.06
<i>Tropaeolum majus</i> L. (leaf)	0.30	0.07
<i>Solanum muricatum</i> (fruit)	0.07	0.00
<i>Stachys byzantina</i> K. Koch (leaf)	0.36	0.28
<i>Solanum betaceum</i> Cav. (fruit)	0.11	0.04

No steroids were found in the tests of the extracts of *Solanum betaceum* Cav. and *Solanum muricatum*, and only the extract from *Solanum betaceum* Cav. tested positive for flavonoids. The results were negative in the remaining tests. The percentage of antioxidant activity determined by sequestering of the DPPH and ABTS radicals increased with increasing concentration, thereby showing a dose-dependent effect for the five species studied. The highest antioxidant activity was observed for *Tropaeolum majus* L. and *Stachys byzantina* K. Koch using the phosphomolibdenum method. Of the five species of vegetables evaluated, *Stachys byzantina* K. Koch presented antioxidant activity by all the methods evaluated. The plants appeared to be devoid of essential oils.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support, a scholarship and a PVNS fellowship (D.L. Nelson).

References

- [1] Brasil. Ministério da Saúde (2002) **Alimentos regionais brasileiros**. Brasília, DF, 140 p.
- [2] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010) **Hortaliças não-convencionais: (Tradicional)/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. MAPA/ACS, Brasília, 52 p.
- [3] Kinupp, V.F. (2009) **Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANCs): Uma Riqueza Negligenciada**. Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC - Manaus, AM, 1-4. http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/mesas_redondas/MR_ValdelyKinupp.pdf
- [4] Kinupp, V.F. and Lorenzi, H. (2014) **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas**. Instituto Plantarum de estudos da Flora, São Paulo.
- [5] Andrade, C.A., Costa, C.K., Bora, K., Miguel, M.D., Miguel, O.G. and Kerber, V.A. (2007) Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17, 231-235. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200017>
- [6] Balestrin, L., Dias, J.F.G., Miguel, O.G., Dallstella, D.S.G. and Miguel, M.D. (2008) Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (*Moraceae*) com abordagem em atividade

antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 230-235. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200016>

[7] Matos, F.J.A. (1988) **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª Edition, Edições UFC, Fortaleza.

[8] Farmacopeia Brasileira, Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** (2010) Farmacopeia brasileira. 5th Edition, Anvisa, Brasília, 1, 198-199.

[9] Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Miguel, M.G.C. and Antunes, M.D.C. (2013) The Effect of Temperature and Film Covers on the Storage Ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, 159, 96-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.030>

[10] Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Kolodziejczyk, P.P. (2008) Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Artemisia* Essential Oils. **Phytochemistry**, 69, 1732-1738. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

[11] Oliveira, C.M. (2015) **Caracterização química, atividade antibacteriana, antitumoral e ensaios antioxidantes do óleo essencial das folhas e flores de *Callistemon viminalis***. 111 p. Dissertação (mestrado)—Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2015.

[12] Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y. (2002) Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolics Phytochemicals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 50, 3713-3717. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020071c>

[13] Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, 35, 1039-1042.

[14] Cunha, A.P. and Batista, M.T. (2010) Taninos. Livro: **Farmacognosia e Fitoquímica**. Parte III. Capítulo 14. 3ª Edição. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. 292-310.

[15] Souza, M.D., Fernandes, R.R. and Pasa, M.C. (2010) Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, 9, 91-100.

[16] Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. and David, J.P. (2006) Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

[17] Suhartono, E., Vianib, E., Rahmadhanb, M.A., Gultomb, I.S., Rakhmanb, M.F. and Indrawardhanac, D. (2012) Total flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian. **APCBEE Procedia**, 4, 235-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.039>

[18] Porto, R.G.C.L., Cardoso, B.V.S., Barros, N.V.A., Cunha, E.M.F., ARAÚJO, M.A.M. and Moreira-Araújo, R.S.R. (2014) Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Genipa Americana* L. (Jenipapo) of the Brazilian Cerrado. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, 3, 51-61. <http://dx.doi.org/10.15640/jaes>

[19] Barreto, G.P.M., Benassi, M.T. and Mercadante, A.Z. (2009) Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Online), 20, 1856-1861. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009001000013>

[20] Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the

Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, 337-341. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

[21] Dos Santos, M.H., Batista, B.L., Duarte, S.M.S., Abreu, C.M.P. and Gouvêa, C.M.C.P. (2007) Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova (Impresso)**, 30, 604-610. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300020>

[22] Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Philosoph-Hadas, S. (1995) Determination and Involvement of Aqueous Reducing Compounds in Oxidative Defense Systems of Various Senescing Leaves. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 43, 1813-1819. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00055a012>

[23] Sudha, G., Priya, M.S., Shree, R.B.I. and Vadivukkarasi, S. (2012) Antioxidant Activity of Ripe and Unripe Pepino Fruit (*Solanum muricatum* Aiton). **Journal of Food Science**, 77, 1131-1135.

**ARTIGO 2 - POTENCIAL ALELOPÁTICO E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE CINCO ESPÉCIES DE *AMARANTHUS SPP* NA
PLANTA MODELO *LACTUCA SATIVA***

ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

O gênero *Amaranthus* (*Amarantaceas*) compreende plantas que são consideradas como plantas daninhas mas também são utilizadas na culinária e na medicina popular. Essas plantas são ricas em compostos biologicamente ativos que podem ser explorados para produção de bio-herbicidas. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo realizar a triagem fitoquímica em folhas de cinco espécies de *Amaranthus* (*A. spinosum*, *A. viridis*, *A. deflexus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus*), assim como o efeito alelopático do extrato etanólico obtido sobre a germinação, desenvolvimento inicial e ciclo celular de plântulas/células meristemáticas do modelo vegetal *Lactuca sativa* L. (alface). Ácidos orgânicos, carotenoides e esteroides, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, azulenos, depsídeos, cumarinas e saponinas foram identificados na triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de pelo menos uma das cinco espécies estudadas. As concentrações de extrato testadas (0,25 a 4 g/L) inibiram de forma dose-dependente a germinação e o índice de velocidade de germinação das sementes de *L. sativa*. A maior concentração testada (4g/L) apresentou inibição superior a 95% para todas as espécies da pesquisa. Nas análises microscópicas, efeito mitodepressivo foi observado para os extratos de *A. spinosum*, *A. viridis*, enquanto que os extratos de *A. deflexus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus* induziram um aumento significativo na frequência de células mitóticas com alterações cromossômicas, das quais c-metáfases e cromossomos aderentes foram as mais frequentes. Núcleos condensados (NC) também foram observados como consequência da exposição das células aos extratos, tendo aumento significativo para os tratamentos com extratos de *A. spinosum*, *A. deflexus* e *A. retroflexus*. O extrato de *A. spinosum* se mostrou o mais promissor para a produção de bio-herbicidas tendo como mecanismo inibidor do crescimento da planta a ação sobre a proliferação celular.

Palavras-chave: Hortaliças não convencionais. Fitoquímica. Fitotoxicidade. Metabólitos secundários. Citogenotoxicidade.

ABSTRACT

The genus *Amaranthus* (*Amarantaceas*) comprises plants that are considered as weeds, but are also used as food and in folk medicine. These plants are rich in biologically active compounds that can be exploited to produce bio-herbicides. In this sense, the present work objective to evaluate the allelopathic effect of the ethanol extract of leaves from five species of *Amaranthus* (*A. spinosum*, *A. viridis*, *A. deflexus*, *A. hybridus* and *A. retroflexus*) through phytochemical screening followed by the effects on germination, initial development and cell cycle of seedlings or meristematic cells of *Lactuca sativa* L. (lettuce). All the five species studied presented organic acids, carotenoids and steroids in the ethanolic extract. Polysaccharides, proteins and amino acids, azulenes, depsides, coumarins and saponins were observed in extracts of at least one of the evaluated species. The extract concentrations tested (0.25 to 4 g/L) inhibited dose-dependently the germination and the speed index germination of the *L. sativa* exposed seeds. The highest concentration tested (4 g/L) showed inhibition higher than 95% in all extracts tested. Consequently, a significant reduction in the development of treated seedlings was observed. In the microscopic analysis, mitodepressive effect was observed for extracts of *A. spinosum* and *A. viridis*, meanwhile the extracts of *A. deflexus*, *A. hybridus* and *A. retroflexus* induced a significant increase in the frequency of mitotic cells with chromosomal alterations, including c-metaphases and adherent chromosomes as the most frequent ones. Condensed nuclei (NC) were also observed as a consequence of cell exposure to the extracts, with a significant increase for the treatments with extracts of *A. spinosum*, *A. deflexus* and *A. retroflexus*.

Keywords: Unconventional vegetables. Phytochemistry. Phytotoxicity. Secondary metabolites. Cytogenotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

A família Amaranthaceae contem 160 gêneros e cerca de 2.400 espécies, encontradas em todos os continentes (LORENZI e MATOS, 2008). O gênero *Amaranthus* abriga espécies de crescimento rápido que podem desenvolver-se em diferentes condições (DYNER, 2007). Dez destas espécies apresentam ocorrência generalizada no Brasil e apresentam importância por serem plantas invasoras (SAMARTINI et al., 2016). No entanto, algumas espécies são cultivadas como hortaliças ou para produção de grãos em vários países. Além disso, algumas espécies têm propriedades anti-inflamatória (*A. viridis*), anti-diabética (*A. spinosus*) e imunomoduladora (*A. spinosus*) comprovadas (HUSSAIN et al., 2009; GIRIJA e LAKSHMAN, 2011; REYAD-UL-FERDOUS et al., 2015), sendo utilizadas na medicina popular (SRAVAN et al., 2011).

O metabolismo secundário dos vegetais tem se mostrado fonte quase inesgotável de compostos com infinitas atividades biológicas (SANTOS et al., 2006). Dentro dessa perspectiva os aleloquímicos provenientes das rotas secundárias tem sido investigados quanto ao potencial alelopático, em especial na capacidade de inibir a germinação e o desenvolvimento de plantas (FRITZ et al., 2007). Atuando como plantas invasoras, esses vegetais promovem a liberação de produtos químicos no solo afetando, conseqüentemente, outras espécies vizinhas, geralmente em detrimento delas (PRATLEY, 1996). Esse fenômeno fitotóxico é conhecido como alelopatia (Silva et al., 2012). A ação da alelopatia deve-se a substâncias inibitórias que são liberadas diretamente da planta para o ambiente por meio da exsudação radicular, lixiviação e através da decomposição de resíduos vegetais (RICE, 1984).

De acordo com Inderjit e Duke (2003), estudos indicaram que a alelopatia pode ser utilizada no manejo integrado de ervas daninhas. Tradicionalmente a busca por produtos naturais com atividade alelopática tem sido realizada a partir do extrato do material vegetal em questão (SANTOS et al., 2012), como *Lactuca sativa* (alface), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Cucumis sativus* (pepino) (TORRES et al., 2004) por meio de bioensaios de germinação e desenvolvimento da plântula (TUR et al., 2010). Destas, *L. sativa* é o organismo-teste mais utilizado para avaliar a alelopatia de produtos naturais, pois apresenta sensibilidade aos aleloquímicos, mesmo quando estes ocorrem em baixas concentrações (SOUZA et al., 2007), além de ter rápida germinação (até 24h), desenvolvimento de radícula e parte aérea linear (TIGRE et al., 2012). Recentemente, a possibilidade de ser aplicada como modelo para avaliação microscópica, em que o efeito do extrato de interesse é avaliado sobre

o ciclo celular, tem sido apontado como grande vantagem, pois os mecanismos de ação dos aleloquímicos também são levados em consideração (ARAGÃO et al., 2015).

Em virtude dos fatos mencionados e visando contribuir com o conhecimento sobre as propriedades de cinco espécies de *Amaranthus*, os objetivos desse trabalho foram realizar a triagem fitoquímica das espécies *Amaranthus spinosus* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus deflexus* L. e *Amaranthus retroflexus* L, em conjunto com a atividade alelopática dos extratos, através de bioensaios de germinação, desenvolvimento inicial da plântula e ciclo celular no modelo *L. sativa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos de *Amaranthus*

Folhas jovens das espécies de *Amaranthus* utilizadas nesse estudo foram coletadas na coleção de hortaliças não convencionais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras no mês de junho de 2014 e em seguida encaminhadas ao laboratório de Química Orgânica - Óleos essenciais do Departamento de Química da mesma universidade. As folhas foram secas em estufa, a 35°C durante 72h. Após seco, 50 gramas do material de cada espécie foram colocados em um balão de 1000ml, acoplado a um condensador de refluxo, com etanol, permanecendo em refluxo lento por 8 horas, com temperatura constante de 80°C. Após esse período, filtrou-se a mistura em um funil de Buchner e o etanol foi evaporado em um evaporador rotatório Büchi B-114 (Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça), obtendo o extrato de cada planta utilizado nas análises realizadas no estudo.

O material vegetal foi identificado, herborizado e os vouchers foram depositados no Herbário da EPAMIG ou da Universidade Federal de Lavras com os seguintes registros: 58004 (*A. spinosum*), 5800 (*A. viridis*), 58003 (*A. hybridus*), 58001 (*A. retroflexus*) e 8821 (*A. deflexus*), sendo este último o único que se encontra no Herbário da UFLA.

2.2 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários (ácido orgânico, açúcar redutor, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, taninos, catequinas, flavonoides, glicosídeos cardíacos, sesquiterpenlactonas e outras lactonas, azulenos, carotenoides, esteroides, depsídeos, derivadas de cumarina, saponinas, alcaloides, purinas e antraquinonas) foram realizadas de acordo com o descrito por Matos (1988) citado por Carvalho et al, (2015).

2.3 Exposição das sementes aos extratos

Sementes de *Lactuca sativa*, cultivar Verônica, foram utilizadas como planta modelo para avaliação do potencial alelopático dos extratos das folhas de espécies de *Amaranthus sp.* O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de cinco repetições. Cada repetição era constituída por uma Placa de Petri (9cm de diâmetro) com 30 sementes. As sementes foram dispostas em papel filtro umedecido com 5mL de cada extrato. Para cada espécie de *Amaranthus* testada, cinco concentrações (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 g/L) de extrato foram avaliadas. O controle negativo (água destilada) foi um dos tratamentos. Após tratamento, as placas foram mantidas em BOD a 24° ± 2°C no escuro durante todo o

período do experimento (NARWAL; SAMPIETRO; CATAÁN, 2008). O papel filtro foi mantido úmido por meio de regas com 0,5ml, com os respectivos extratos, e concentrações, quando necessário.

2.4 Análises Macroscópicas

O percentual de sementes germinadas foi obtido após 8, 16, 24, 36 e 48h de exposição aos tratamentos, enquanto que o crescimento radicular e da parte aérea foi obtido com auxílio de paquímetro digital após 96h de exposição aos extratos de *Amaranthus sp.* de acordo com Narwal et al., (2008). A partir dos dados obtidos os seguintes parâmetros foram avaliados: porcentagem de germinação (protrusão de radícula) após 48h (GR), o índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR) e crescimento da parte aérea (CP), em mm, segundo Aragão et al., (2015).

2.5 Análises Microscópicas

Para avaliação da citogenotoxicidade e mecanismo de ação dos extratos de *Amaranthus sp.* as sementes de *L. sativa* foram expostas conforme o descrito no item 2.3 à concentração referente ao IC₅₀ (concentração que inibe em 50% o crescimento radicular) de cada extrato testado, calculado a partir da obtenção da curva de CR (Luber et al., 2015). Após 48h de exposição as raízes emitidas pelas sementes foram coletadas e fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1), sendo armazenadas a – 20 °C por pelo menos 24 horas.

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento. O núcleo e cromossomos foram corados com reativo de Schiff (1h e 30 minutos no escuro a temperatura ambiente) e as células foram coradas com carmin acético 2%. Cada lâmina foi preparada com 2 meristemas tratados, sendo avaliadas 10 lâminas por tratamento (2 lâminas de cada placa de petri). Para cada lâmina foram avaliadas 1000 células, totalizando 10.000 células meristemáticas observadas por tratamento.

As diferentes fases da divisão mitótica bem como possíveis alterações cromossômicas e nucleares foram observadas e anotadas. Os seguintes parâmetros foram obtidos: índice mitótico (IM), frequência de alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), calculadas segundo Aragão et al., (2015).

2.6 Análise estatística

Os parâmetros avaliados no estudo (GR, IVG, CR, CP, IM, AC e NA) foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para o CR e CP foi realizada uma análise de

regressão. Para os outros parâmetros as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem Fitoquímica

Nas cinco espécies de *Amaranthus sp.* avaliadas a triagem fitoquímica foi realizada para 18 classes de compostos químicos (TABELA 1), dos quais nove não foram detectados em nenhum dos extratos avaliados. Das nove classes restantes, ácido orgânico, carotenoides e esteroides foram observados em todos os extratos etanólicos de folhas das espécies de *Amaranthus* (TABELA 1), enquanto que para os metabólitos polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, azulenos, depsídeos, cumarinas e saponinas houve resultado positivo em extratos de pelo menos uma das espécies de *Amaranthus sp.* avaliados (TABELA 1).

A. spinosus foi a única espécie que apresentou resultado positivo para polissacarídeos e *A. hybridus* foi a única que não apresentou proteínas e aminoácidos dentre seus metabólitos (TABELA 1). *A. spinosus* e *A. retroflexus* apresentaram resultados positivos quanto a presença de azulenos e saponinas (TABELA 1). Referente aos depsídeos, resultados positivos foram observados para *A. spinosus*, *A. viridis* e *A. deflexus*. Para os derivados de cumarina, as espécies *A. spinosus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus* tiveram respostas positivas.

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos de *Amaranthus sp.*

Classe Química	<i>A. spinosus</i>	<i>A. hybridus</i>	<i>A. viridis</i>	<i>A. deflexus</i>	<i>A. retroflexus</i>
Ácido Orgânico	+	+	+	+	+
Açúcar Redutor	-	-	-	-	-
Polissacarídeos	+	-	-	-	-
Aminoácidos e Proteínas	+	-	+	+	+
Taninos	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	-
Glicosídeos Cardíacos	-	-	-	-	-
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	-	-	-	-	-
Azulenos	+	-	-	-	+
Carotenoides	+	+	+	+	+
Esteróides	+	+	+	+	+
Depsídeos	+	-	+	+	-
Cumarinas e derivados	+	+	-	-	+
Saponinas	+	-	-	-	+
Alcalóides	-	-	-	-	-
Purinas	-	-	-	-	-
Antraconas	-	-	-	-	-

Avaliando a capacidade fitoquímica e antioxidante *in vitro* de diferentes frações de *Amaranthus graecizans*, Ishtiaq et al. (2014) revelaram a presença de taninos, flavonoides, açúcares, alcalóides e saponinas, mesmo que alguns desses dados tendo sido obtidos por métodos diferentes do presente trabalho. Kraujalis et al. (2013) avaliando a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais em *Amaranthus* por diferentes métodos constataram maior presença de compostos fitoquímicos nas folhas e flores dessas plantas.

De acordo com Gupta e Prakash (2009), as folhas de amaranto possuem alta atividade antioxidante quando comparando com muitos outros vegetais convencionais. Eles também são uma boa fonte de ferro e provitamina A; sendo assim, a sua inclusão na dieta pode ajudar a superar vários problemas ligados à saúde (SINGH et al., 2001; SHUKLA et al., 2003).

A presença de Cumarina foi detectada nas espécies *A. spinosus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus*. Segundo Rojas et al. (1999) uma das classes desses compostos são encontrados na espécie *Zornia diphylla* Pers, sendo esses compostos derivados do metabolismo da

fenilalanina e que se encontram distribuídos predominantemente nas angiospermas. As furanocumarinas, uma das classes das cumarinas, tem atraído uma atenção especial dada a sua fitotoxicidade, pois esses compostos fotoativados podem se inserir na dupla hélice do DNA e ligar-se às bases pirimídicas, citosina e timina, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA, provocando, ocasionalmente, a morte celular (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Outra classe de compostos fitoquímicos são os depsídeos, sendo essas substâncias fenólicas, obtidos a partir de acetil- CoA (HARBORNNE, 1998). Terapeuticamente, esse grupo têm sido reconhecido por apresentar propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas (MACEDO et al., 2007).

De acordo com MARASCHIN-SILVA e AQUILA (2006), os aleloquímicos podem apresentar ação direta ou indireta sobre a planta alvo. Segundo os autores, alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o solo são consideradas como efeitos indiretos. Os efeitos diretos, por sua vez, são mais estudados e compreendem alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras (RICE 1984; RIZVI et al., 1992; REIGOSA et al., 1999). As saponinas, os taninos e os flavonóides estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos, podendo ser liberados em condições naturais, já que são hidrossolúveis (RICE, 1984; FERREIRA e AQUILA, 2000).

Estudando o amarantos de palma (*Amaranthus palmeri*), Thilsted e Murray (1980) comprovaram o efeito destas plantas quando incorporado resíduos desta espécie no solo e interferindo no crescimento de mudas de sorgo. Stebbing et al. (2000) comprovaram que *Amaranthus retroflexus* reduziu o rendimento de beterraba em 12% e 31% em uma densidade de plantas de 2 e 3m entre fileiras, respectivamente. Segundo Shimi e Termeh (2004), o *A. retroflexus*, conhecido popularmente no Irã como “Redroot pigweed” é uma das ervas daninhas da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*). Rezaei et al. (2008) constataram que o extrato de *Amaranthus* produziu aleloquímicos que influenciaram na germinação, crescimento e peso seco de sementes de colza (*Brassica napus*).

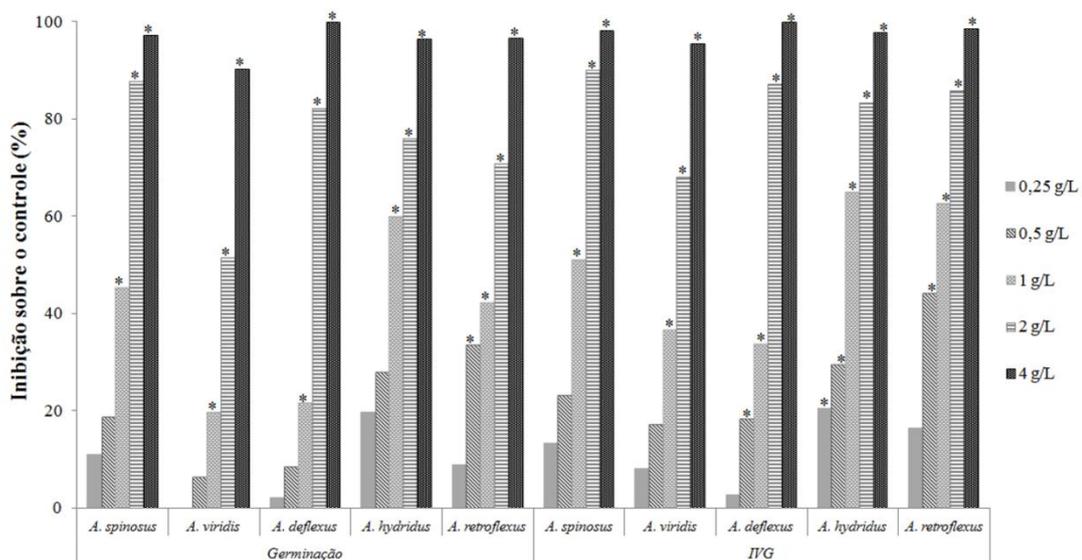
Conforme Namdari et al. (2012), o uso de cultivares de feijoeiro com tolerância elevada à atividade alelopática de *A. retroflexus* (Redroot pigweed) poderia reduzir a necessidade de herbicidas no início da estação de aplicação, com controle de ervas daninhas no final da temporada, fornecido pela competitividade da cultura.

3.2 Efeitos Macroscópicos

Considerando a atividade dos extratos etanólicos das cinco espécies de *Amaranthus sp.* testadas sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *L. sativa*, observou-se uma redução dose-dependente na GR (FIGURA 1). Inibição na germinação, em relação ao controle negativo, significativa, foi observada a partir da concentração de 0,5 g/L para *A. retroflexus* e 1 g/L para as demais espécies. Para todas as espécies foi observada inibição acima de 80% na germinação de sementes de *L. sativa* expostas aos extratos (FIGURA 1).

Em relação a todos os parâmetros macroscópicos obtidos em testes de alelopatia (taxa de germinação, IVG e crescimento da plântula), a germinação é tida como o parâmetro menos sensível (ARAGÃO et al., 2017), enquanto que o crescimento radicular (CR) e da parte aérea (CP) são considerados os mais sensíveis (VALÉRIO et al., 2007) para a detecção de toxicidade de compostos alelopáticos; já o IVG é diretamente afetado pelo atraso da germinação, podendo contribuir para reduções significativas no desenvolvimento da plântula. Neste sentido, como reflexo da inibição da germinação, o IVG das sementes tratadas também apresentou uma redução dose-dependente (FIGURA 1). Para o extrato de *A. hybridus* redução significativa já foi observada no tratamento com a menor concentração do extrato (0,25g/L), enquanto que para *A. deflexus* e *A. retroflexus* reduções significativas foram observadas a partir da concentração 0,5g/L e para os demais a partir de 1g/L (FIGURA 1).

Figura 1 - Inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* expostas por 48 h à cinco concentrações (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 g/L) de extrato etanólico de cinco espécies de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. hybridus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L. e *A. retroflexus*.



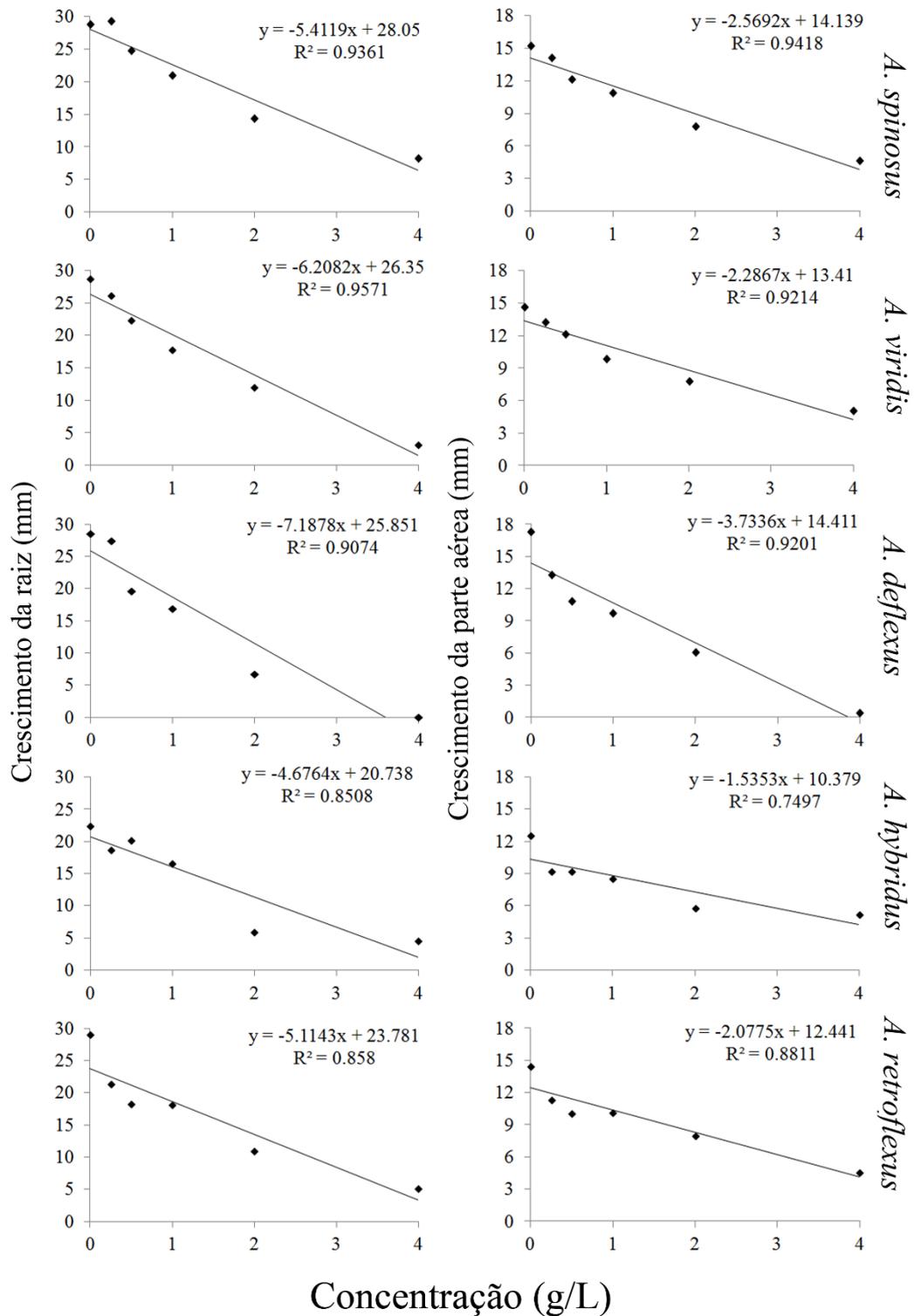
Legenda: Barras seguidas de (*) diferiram estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$) do controle.

Em relação ao desenvolvimento das plântulas de *L. sativa* sobre efeito dos extratos de *Amaranthus sp.*, uma dose-dependência na redução do CR e CP, com o aumento da concentração dos extratos foi observada (FIGURA 2). As regiões da plântula (raiz e parte aérea) responderam de forma semelhante aos tratamentos (FIGURA 2). Para *A. deflexus* não foi observado presença de raiz e parte aérea na maior concentração testada (4g/L).

Para as demais, crescimento radicular mínimo foi observado para *A. viridis*; para parte aérea crescimento mínimo foi observado em plântulas tratadas com extrato (4g/L) de *A. retroflexus* (FIGURA 2). Essas observações demonstram que não há uma relação entre os comportamentos dos diferentes parâmetros acessados para com o extrato em questão. Neste sentido, o extrato ou tratamento que apresenta maior inibição na germinação em uma menor concentração (FIGURA 1), não necessariamente será o que vai apresentar maiores reduções no desenvolvimento da plântula (FIGURA 2).

As curvas de regressão obtidas para o desenvolvimento das plântulas se ajustaram à distribuição dos parâmetros observados com R^2 acima de 85% para o CR e 75% para CP (FIGURA 2), sendo possível fazer o cálculo da concentração que inibe em 50% o desenvolvimento da plântula modelo. Tal concentração é denominada como IC_{50} (inibição do crescimento em 50% em relação ao controle negativo) e, segundo Palmieri et al. (2014) é uma concentração especialmente interessante para os estudos citogenotóxicos pois não é tóxica demais, impedindo o desenvolvimento da raiz, porém é suficientemente tóxica para induzir alterações ao longo do ciclo mitótico, permitindo a discussão sobre os mecanismos de ação dos tratamentos em questão.

Figura 2 - Efeitos dos extratos de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L., *A. hybridus* L., e *A. retroflexus* sobre o desenvolvimento inicial (crescimento radicular e da parte aérea) de plântulas de *Lactuca sativa*.



3.3 Efeitos Microscópicos

As avaliações dos efeitos citogenotóxicos de dado composto são realizadas nas células meristemáticas provenientes da ponta da raiz (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) do vegetal modelo utilizado. Logo, as concentrações de cada extrato de *Amaranthus sp.* utilizadas para fins das análises microscópicas (TABELA 2) foram calculadas a partir das equações obtidas nas curvas de regressão referentes ao CR (FIGURA 2). Com exceção do extrato de *A. hybridus* ($IC_{50} = 1,12g/L$), todas as demais espécies testadas apresentaram IC_{50} em torno de 1,4g/L (TABELA 2).

Os extratos de *A. spinosum* e *A. viridis* apresentaram efeitos mitodepressivos significativos sobre as células de *L. sativa* (TABELA 2). A redução no IM (Índice mitótico) está relacionado com o efeito citotóxico (LEME e MARIN-MORALES, 2009) do extrato estudado. Segundo Fiskesjö (1983) efeitos mitodepressivos acima de 50% é que remetem a toxicidade do composto em questão. Deste modo, apenas o extrato de *A. spinosum*, que apresentou redução de 65% no IM é considerado citotóxico. Esta redução é explicada pela diminuição significativa da frequência de células em metáfase e aumento significativo das células com núcleos condensados (NC).

Tabela 2 - Parâmetro microscópico acessado em células meristemáticas de pontas de raízes de *L. sativa* após exposição de extratos etanólicos de *Amaranthus sp.*

Tratamentos	IC_{50}	Índice Mitótico	Fases da Mitose (%)				Total de alterações do ciclo celular (%)	Núcleo condensado (%)
			PRO	MET	ANA	TEL		
(-) controle	-	7,59	52,83	25,22	10,13	11,82	0,05	0,55
<i>A. spinosum</i>	1,44	2,71*	50,77	9,62*	18,04*	21,57*	0,22	3,634*
<i>A. viridis</i>	1,43	5,42*	52,26	22,60	15,47	9,66	0,66	0,664
<i>A. deflexus</i>	1,43	6,85	54,32	22,68	12,37	10,64	0,69*	2,438
<i>A. hybridus</i>	1,12	6,08	56,95	15,37*	14,43	13,25	0,56*	4,036*
<i>A. retroflexus</i>	1,46	6,68	51,64	19,14	17,20*	12,02	0,66*	1,528

As médias seguidas por (*) são significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. O controle (-) aplicado para o extrato de *Amaranthus sp.* foi água destilada. IC_{50} = Concentração de Inibição (%) de 50% sobre o controle (-). PRO = profase; MET = metáfase; ANA = anáfase; TEL = telófase.

Os NC (núcleos condensados) representam outro parâmetro indicador de citotoxicidade de compostos químicos. Eles são caracterizados pela heterocromatinização do núcleo interfásico comum e apresentam-se na observação microscópica mais fortemente

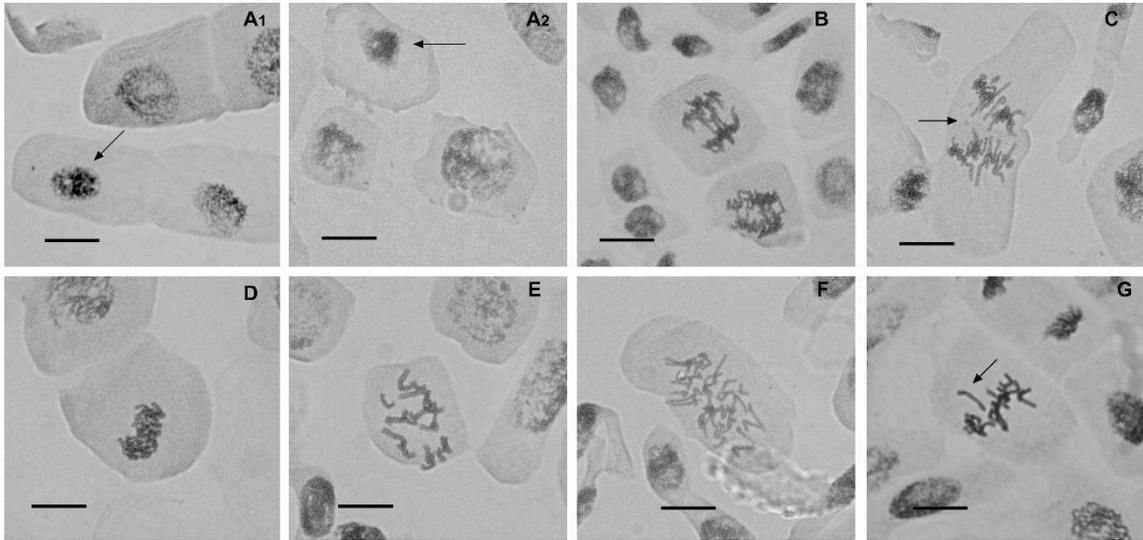
corados e menores que os núcleos em G₁ (FIGURA 3A). Além disso, são a evidência citológica da ocorrência de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012) em função do efeito do tratamento.

Além do extrato de *A. spinosum*, os extratos de *A. hybridus* também apresentou aumento significativo da frequência de células com NC. As saponinas presentes no extrato de *A. spinosum* e *A. retroflexus* tem propriedade detergente podendo ligar-se a membranas celulares, afetando o funcionamento celular, o que pode estar ocasionando a morte das células (RIZVI e RIZVI, 1992; KOKATE, 2004).

Um dos fatores que podem levar as células a ativar os mecanismos de morte celular, refletindo no aumento da frequência de NC, é a ocorrência de danos não reparados no DNA. As alterações ao longo do ciclo mitótico observadas, demonstram que os extratos de *Amaranthus* testados induzem tanto quebras no DNA, que podem ser inferidas a partir da presença de pontes (FIGURA 3B), fragmentos (FIGURA 3C) e cromossomos aderentes (FIGURA 3D) (FERNANDES et al., 2007), classificadas como alterações clastogênicas, como interferem na ligação dos cromossomos ao fuso mitótico (FREITAS et al., 2016), observadas a partir da presença de c-metáfases (FIGURA 3E) células poliplóides (FIGURA 3F) e cromossomos não orientados/atrasados/perdidos (FIGURA 3G), as quais caracterizam o mecanismo aneugênico (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

A frequência total dessas alterações citadas foi significativa para os extratos de *A. deflexus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus* (TABELA 2). Aumentos em até 17,25 vezes em relação ao controle foi observado nas células tratadas com extrato de *A. deflexus*. Para os extratos de *A. spinosum* e *A. viridis* o aumento no total de alterações não foi significativo. Essas foram as duas espécies de *Amaranthus* cujos extratos apresentaram reduções significativas no IM. A explicação pode ser dada de acordo com a observação de Andrade et al. (2008) que afirma que os tratamentos que diminuem a frequência de células em divisão, tendem a ter menor frequência de células com alterações já que a observação da alteração depende da observação de altos IM (índice mitótico).

Figura 3 - Exemplo de alterações no ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos de *Amaranthus sp*: (A1 e A2) heterocromatização do núcleo interfásico dos extratos (Setas); (B) ponte em anáfase; (C) fragmento (Seta); (D) cromossomos aderentes; (E) c-metáfase; (F) poliploide; (G) cromossomo não orientado.



Dentre as diferentes alterações cromossômicas observadas nas células meristemáticas de *L. sativa* tratadas (FIGURA 4), aquelas tratadas com extratos de *A. viridis* e *A. hybridus* apresentaram todas as alterações observadas. *A. spinosum* induziu preferencialmente alterações aneugênicas, sendo cromossomos não orientados as mais frequentes, seguida de c-metáfases. Ambas alterações são relacionadas a problemas da ligação dos cromossomos ao fuso mitótico. Enquanto a c-metáfase é decorrente da ausência do fuso (FERNANDES et al., 2007), a qual leva a orientação aleatória dos cromossomos na célula, diferente da organização na placa equatorial em uma metáfase normal, a não orientação dos cromossomos, que pode levar a perda do mesmo em anáfase/telófase, está relacionada com efeito epigenético na fosforilação da serina 10 da histona H3 na região pericentromérica (FREITAS et al., 2016), a qual é requerida para o reconhecimento do cromossomo pelo fuso.

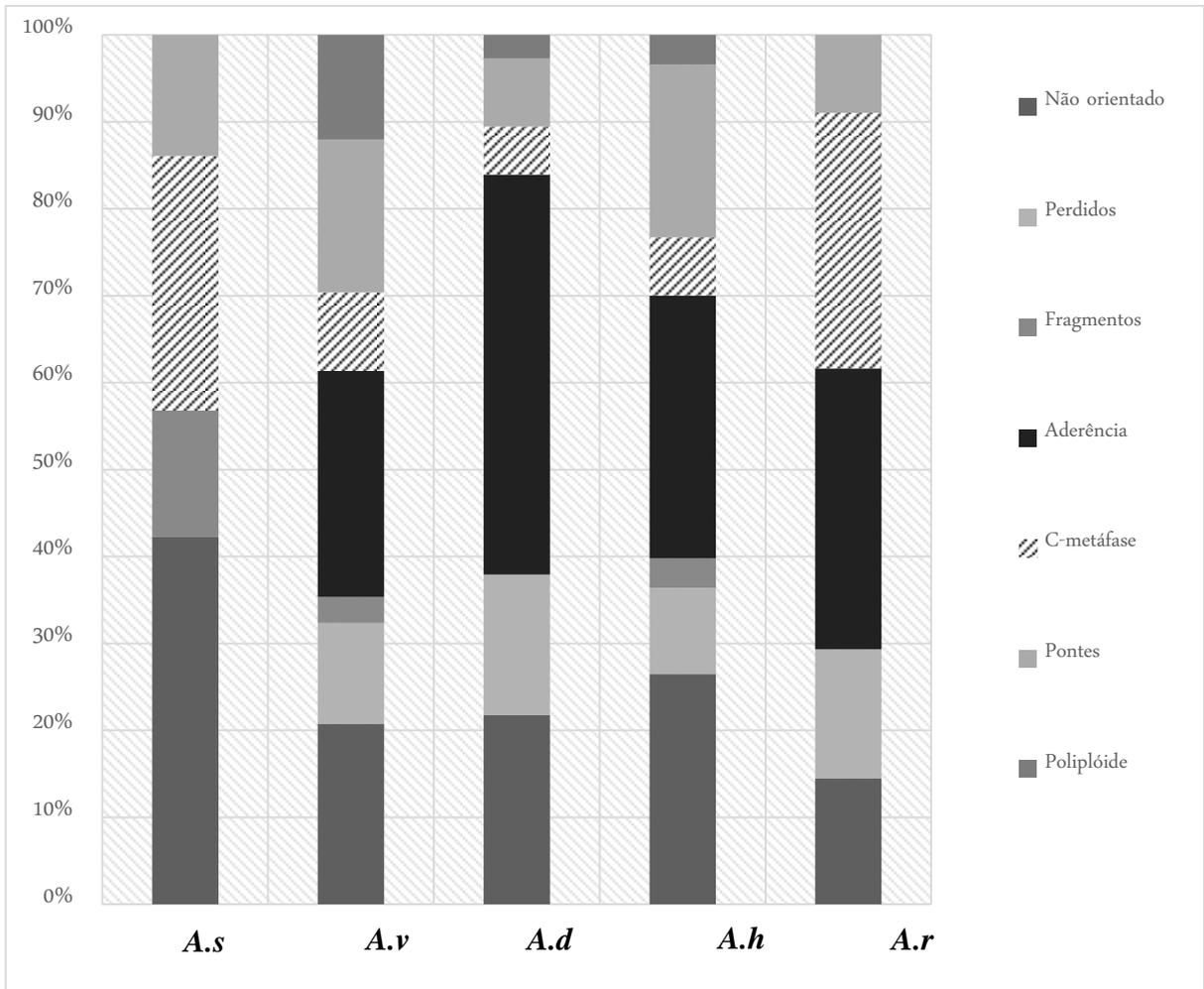
Em células tratadas com extrato de *A. viridis* a aderência cromossômica foi a alteração mais frequente, seguida de cromossomos não orientados e pontes, que foram observadas em proporções bem próximas (FIGURA 4). A aderência é uma alteração de efeito inicial aneugênico (FERNANDES et al., 2007) que posteriormente pode estar relacionado com quebras e formação de pontes intercromatídicas (El GHAMERY et al., 2003). Esta alteração é considerada como genotoxicidade extrema do tratamento em questão e foi observada em mais

de 50% das células tratadas com extrato de *A. deflexus* (FIGURA 4), podendo estar relacionado com a inibição da germinação observada nas análises macroscópicas.

Para o tratamento com extrato de *A. hybridus*, além da aderência e cromossomos não orientados, as pontes foram frequentes (FIGURA 4). Elas são consequência de quebras seguida de fusão e formação de cromossomos dicêntricos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Durante a anáfase e telófase, cada centrômero deste cromossomo dicêntrico se liga ao fuso de um dos pólos da célula. As cromátides entre os centrômeros ficam ligadas e, portanto, a anáfase/telófase, fica com aspecto de uma ponte entre os dois pólos (FIGURA 3B). Em geral as pontes estão relacionadas com a presença de fragmentos, uma vez que a quebra gera fragmentos acêntricos que não se ligam ao fuso e ficam à deriva no citoplasma das células durante a divisão (CAMPOS et al., 2008).

Além dessas alterações, todos os extratos induziram a formação de células poliploides (FIGURA 4). As células poliploides são consequência do efeito do composto químico no fuso (FERNANDES et al., 2009). Quando o composto impede a formação do fuso mitótico, o ciclo celular continua de forma que a célula entra em G1 sem finalizar a divisão longitudinal dos cromossomos que ocorreria na anáfase. Deste modo, após a degradação das coesinas, que mantinham as cromátides irmãs unidas (ZAMARIOLA et al., 2014), cada cromátide vira uma molécula de DNA, na ocasião da duplicação do DNA, antes de uma nova divisão mitótica, todas as moléculas de DNA são duplicadas e assim a célula inicia a mitose com o número de cromossomos duplicados. Esta alteração no aumento da quantidade de cromossomos é caracterizada poliploidia.

Figura 4 - Distribuição das aberrações cromossômicas observadas no ciclo celular de células meristemáticas da ponta radicular de *Lactuca sativa* expostas a extratos etanólicos de *Amaranthus*: *A. spinosus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L. *A. hybridus* L., e *A. retroflexus*.



4 CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos de *A. spinosum*, *A. viridis*, *A. deflexus*, *A. hybridus* e *A. retroflexus* apresentam, ácido orgânico, carotenoides e esteroides dentre seus compostos metabólitos além de polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, azulenos, depsídeos, cumarinas e saponinas, os quais a presença depende do extrato em questão.

O efeito sinérgico desses metabólitos apresenta atividade alelopática no modelo *L. sativa* com fitotoxicidade expressiva, atuando, principalmente na ligação dos cromossomos com o fuso mitótico, impedindo a divisão celular. *A. spinosum*, que apresenta todas as classes de compostos químicos observadas nos extratos, mostra-se a espécie mais promissora para futuras investigações sobre a possibilidade de criação de bio-herbicidas a partir dos compostos de seu metabolismo secundário.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L.F., CAMPOS, J.M.S., DAVIDE, L.C., 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (*spent potliners*) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 71,706–710.
- ANDRADE-VIEIRA, L.F., CAMPOS, J.M.S., DAVIDE, L.C., 2012. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **J. Environ. Manag.** 107,140–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.008>.
- ANDRADE-VIEIRA, L.F., BOTELHO, C.M., LAVIOLA, B.G., PALMIERI, M.J., PRAÇA-FONTES, M.M., 2014. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 86(1),373–382.
- ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T; FERREIRA, A; COSTA, A. V; PINHEIRO, P. F; CARRIJO, T. T & ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae).** 2017. Revista de Biología Tropical. Accepted for publication in September 26th, 2016.
- ARAGÃO, F. B., PALMIERI, M. J., FERREIRA, A., COSTA, A.V., QUEIROZ, V.T., PINHEIRO, P.F., & ANDRADE-VIEIRA, L.F. 2015. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**, vol.35, pp.259–272.
- CAMPOS, J. M. S., VICCINI, L. F., ANDRADE, L. F., DAVIDE, L.C and RODRIGUES, G. S. 2008. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions.** In: Plant Bioassays. Ed. Houston: Studium Press, 344 p.
- CARVALHO, M. S. S; CARDOSO, M. G.; RESENDE, L. V.; GOMES, M. S.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; GOMES, A. C. S.; SALES, T.A.; CAMARGO, K. C.; NELSON, D. L.; COSTA, G. M.; ESPÓSITO, M. A.; SILVA, L. F. L. Phytochemical Screening, Extraction of Essential Oils and Antioxidant Activity of Five Species of Unconventional Vegetables. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, p. 2632-2639, 2015.
- DYNER, L. Composición y aporte potencial de hierro, calcio y zinc de panes y fideos elaborados con harinas de trigo y amaranto. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 1, 2007.
- EL-GHAMERY A.A., EL-KHOLY M.A. & ABOU EL-YOUSER M.A. 2003. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum*.L. **Mutat. Res.** 537: 29–41.
- FERNANDES, T.C.C., MAZZEO, D.E.C., MARIN-MORALES, M.A., 2007. Mechanism of micronucleiformation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.** 88, 252–259.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12(Edição especial): 175-204.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FISKESJÖ, G., 1983. Nucleolar dissolution induced by aluminum in root cells of *Allium*. **Physiol. Plant.** 59, 508–511.

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

FRITZ, D. *et al.* Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.44-48, 2007.

GIRIJA, K; LAKSHMAN, K. Antihyperlipidemic activity of metanol extracts of three plants of *Amaranthus* in triton-WR 1339 induced hyperlipidemic rats. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 2011; 1: s62-s65.

GUPTA, S; PRAKASH, J. (2009) Studies on Indian green leafy vegetables for their antioxidant activity. **Plant Foods Hum. Nutr.** 64:39–45.

HARBORNNE, J. B. **Phytochemical Methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HUSSAIN ZEESHAN; AMRISH, G; SINGH, SATYAWAN; RAO CHANDANA VENKATESWARA. Anti diarrheal and anti ulcer effect of *Amaranthus spinosus* Linn. **Pharmaceutical Biology**. 2009; 47: 932 – 39.

INDERJIT, DUKE, S. O. 2003. **Ecophysiological aspects of allelopathy**. *Planta*. 217: 529-639.

ISHTIAQ, S; AHMAD, M; HANIF, U; AKBAR, S; MEHJABEEN; KAMRAN, S. H. Phytochemical and in vitro antioxidant evaluation of different fractions of *Amaranthus graecizans* subsp. *silvestris* (Vill.) Brenan. **Asian Pac. J. Trop. Med.** 2014; 7(Suppl 1): S342-S347.

KOKATE C. K. Determination of leaf surface data (Leaf constants). *Practical Pharmacognosy*, 4th ed, **Vallabh Prakashan**, Delhi, 2004, 115 - 21.

KRAUJALIS, P; VENSKUTONIS, P. R; KRAUJALIENE, V; PUKALSKAS, A. Antioxidant properties and preliminary evaluation of phytochemical composition of different anatomical parts of *Amaranth*. **Plant Foods Hum. Nutr.** (2013) 68:322–328.

LEME D.M. & MARIN-MORALES M.A. 2009. *Allium cepa* test and environmental monitoring: A review on its application. **Mutat. Res.** 682: 71–81.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Editora *Plantarum*, 576 p. 2008.

- LUBER, JAQUELINI; PALMIERI, MARCEL J.; BOTELHO, CAROLINA M.; RINALDO, Daniel; ANDRADE, L. F. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Lactuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Online). v.87, p.903 - 913, 2015.
- MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v 5, n 2, p 1166-1168, 2007.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. (no prelo), p. 61-69, 2006.
- NAMDARI, T; AMINI, R; SANAYEI, S; ALAVI – KIA, S; MOHAMMADI – NASAB, A. Allelopathic effects of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) root exudates on common bean seedling growth. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**. Vol., 3 (6), 1230-1234, 2012.
- NARWAL, S.S., SAMPIETRO, D.A. and CATALÁN, C.A.N. (2008). Laboratory bioassays in allelopathy. In: Plant Bioassays (Eds., S.S. Narwal, C.A.N. Catalán, D.A. Sampietro, M.A. Vattuone, B. Politycka) pp. 1-20. **Studium Press**, Houston, Texas, USA.
- PALMIERI, M. J., LUBER, J., ANDRADE-VIEIRA, L. F., DAVIDE, L. C., 2014. Citotoxy and phytotoxy effects on the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach. **Mutat. Res.** 763,30–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.008>.
- PRATLEY, J. E. 1996. **Allelopathy in annual grasses**. Plant Protection Quarterly. 11: 213-214.
- REYAD-UL-FERDOUS, M, D; D. M. SHAMIM SHAHJAHAN, SHARIF TANVIR, MOHSINA MUKTI. Present Biological Status of Potential Medicinal Plant of *Amaranthus viridis*: A Comprehensive Review. **American Journal of Clinical and Experimental Medicine**. Special Issue: Herbal Remedies as Alternative to Future Drugs Development and Treatment. Vol. 3, No. 5-1, 2015, pp. 12-17. doi: 10.11648/j.ajcem.s.2015030501.13
- REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences** 18(5): 577-608.
- REZAEI, F; YARNIA, M; MIRSHKARI, B. 2008. Allelopathic effect of *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus* and *Cinodon dactylon* on germination and growth of rapeseed. **J. Agric. Sci.** 4: 41-55.
- RICE, E.L. 1984. **Allelopathy**. 2^a ed. New York, Academic Press.
- RIZVI, S. G. H.; RIZVI, V. **Allelopathy**: basic and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1992. 480p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-2376-1>
- ROJAS, A, BAH, M, ROJAS, JI, SERRANO, V, PACHECO, S. (1999) Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine** 6: 367-371.

- SAMARTINI, C. Q.; RESENDE, L. V.; TECHIO, V. H.; BRAZ, G. T.; SILVA, L. F. L.; RESENDE, K. F. M. Número cromossômico e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Amaranthus* (*Amaranthaceae*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v. 51, p. 998-1001, 2016.
- SANTOS, F.V., MESQUITA, S.F.P., FARIA, M.J.S.S., POERSH, A., MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., MORIMOTO, H.K., CÓLUS, I.M.S., 2006. Absence of mutagenicity in somatic and germ cells of mice submitted to subchronic treatment with an extract of *Croton cajucara* Benth. (*Euphorbiaceae*). **Genetics and Molecular Biology**. 29, 159–165.
- SANTOS, V. H. M. **Potencial alelopático de extratos e frações de *Neea theifera* Oerst. (*Nyctaginaceae*) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa***. 2012. 251f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Ecofisiologia) - Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.
- SHIMI, P; TERMEH, F. 2004. **Weeds of Iran**. Ministry of Agriculture. Tehran. Iran. J. 92: 855-860.
- SHUKLA, S; PANDEY, V; PACHAURI, G; DIXIT, B. S; BANERJI, R; SINGH, S. P. (2003) Nutritional contents of different foliage cuttings of vegetable *Amaranth*. **Plant Foods Hum. Nutr.** 58:1–8
- SILVA, R.M.G.; LIVIO, A.A., SANTOS, V.H.M.; MECINA, G.F.; SILVA, L.P. 2012. Allelopathy and phytotoxicity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Allelopath. J.** 30, 221-234.
- SINGH, G; KAWATRA, A; SEHGAL, S. (2001) Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. **Plant Foods Hum. Nutr.** 56:359–364.
- SOUZA, C. S. M.; SILVA, W. L. P.; GUERRA, A. M. N. M.; CARDOSO, M. C. R.; TORRES, S. B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 2, p. 96-100, 2007.
- SRAVAN, P. M; VENKATESHWARLU, G. K; VIJAYA, B, P; SUVARNA D. C. H. DHANALAKSHMI, C. H. SANJUSHA. Effects of anti-inflammatory activity of *Amaranthus viridis* Linn. **Scholars Research Library Annals of Biological Research**, 2011, 2 (4): 435-438.
- STEBBING, J. A; WILSON, R. G; MARTIN, A. R; SMITH, J. A. 2000. Row spacing, redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) density, and sugar beet (*Betavulgaris*) cultivar effects on sugar beet development. **J Sugar Beet Res.** 37: 11-31.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre, Artmed. 2009, 719p.
- TIGRE, R. C., SILVA, N. H., SANTOS, M. G., HONDA, N. K., FALCÃO, E. P. S., & PEREIRA, E. C. (2012). Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 84, 125–132.

THILSTED, E; MURRAY, D. S. 1980. Effect of wheat straw on weed control in no-tillage soybeans. **Southern Weed Science Society**. 33: 42-46.

TORRES, S. B.; INNECCO, R.; MEDEIROS, S. F. & ALVES, M. C. S. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz da alface. **Pesquisa Agropecuária Brasasileira**.39: (11) 1083-1086.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Revista Biotemas**, Florianópolis, SC, v. 2, n. 23, p. 13-22, 2010.

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

ZAMARIOLA, L.; TIANG, C.L.; De STORME, N.; PAWLOWSKI, W.; and GEELEN, D. 2014. Chromosome segregation in plant meiosis. **Front Plant Sci**. 5:279. 10.3389/fpls.2014.00279.