POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO AQUOSO FOLIAR DE *Passiflora edulis* E *Passiflora mucronata* EM *Lactuca sativa*

Jéssika Santos de Oliveira[1], Loren Cristina Vasconcelos[1], Ricardo Dias Alixandre[2], Larissa Carolina Lopes de Jesus[1], Isabelly da Silva Izidio[1], José Carlos Lopes[2], Milene Miranda Praça Fontes[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento/Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, jessika.oliveira@edu.ufes.br, loren.vasconcelos@edu.ufes.br, larissa.c.jesus@edu.ufes.br, sisabelly010@gmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br

[2]Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/ Departamento de Agronomia/ Laboratório de Análise e Qualidade de Sementes, ricardoalixandre@gmail.com, jclufes@gmail.com

Resumo

Para controlar plantas invasoras, o estudo dos efeitos alelopáticos de metabólitos secundários de plantas tem se expandido. Esses compostos podem servir como alternativas sustentáveis, como bioherbicidas. Este estudo buscou analisar o efeito alelopático de extratos aquosos das folhas de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá roxo) e *Passiflora mucronata* Lam. (maracujá-de-restinga), na germinação e crescimento de sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface). Os extratos foram obtidos, filtrados e diluídos em concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 m/mL^{-1}, com quatro repetições por concentrações, água como controle negativo e glifosato como controle positivo. A análise macroscópica avaliou germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e aéreo, enquanto a análise microscópica abordou a citotoxicidade, incluindo índice mitótico e alterações cromossômicas/nucleares. A concentração de extrato em 100 mg mL^{-1} das folhas de *P. adulis Sims* apresentou efeito alelopático no desenvolvimento inicial das plântulas de alface. Os extratos das folhas de *P. mucronata*, nas concentrações de 50 mg mL^{-1} e 100 mg mL^{-1}, apresentaram efeitos semelhantes ao glifosato. Os extratos apresentaram efeitos genotóxicos e citotóxicos, evidenciados pelas alterações cromossômicas/nucleares observadas.

Palavras-chave: Aleloquímicos. Bioherbicida. Citotoxicidade. Fitotoxicidade

Área do Conhecimento: (Ciências Biológicas)

Introdução

A alelopatia é um fenômeno ecológico natural e é conhecido e utilizado na agricultura desde a antiguidade (Zeng, 2014). Os aleloquímicos podem estimular ou inibir a germinação e o crescimento das plantas e permitir o desenvolvimento de culturas com baixas quantidades de resíduos fitotóxicos na água e no solo (Macias *et al*., 2003; Zeng *et al*., 2008). Eles são um substituto adequado para herbicidas pois não apresentam efeitos residuais ou tóxicos (Bhadoria, 2011).

Os aleloquímicos consistem principalmente em metabólitos secundários que são liberados no meio ambiente por vias naturais, como volatilização, lixiviação de folhas, decomposição de resíduos e/ou exsudação de raízes (Inderjit e Nilsen, 2003). Esses compostos químicos, resultantes do metabolismo secundário das plantas, têm sido amplamente reconhecidos por sua eficácia em bioensaios vegetais (Pandard *et al*., 2006), demonstrando seu potencial alelopático ao afetar a capacidade de germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas (Pawlowski, 2012).

Segundo Braga *et al* (2010), sabe-se que algumas espécies frutíferas, como *Passiflora edulis*, apresentam substâncias inibidoras, como os compostos secundários. Por ser um dos centros de origem do maracujá, o Brasil dispõe de uma ampla variabilidade genética e natural para as características diversas do fruto e da planta (Faleiro *et al*., 2011). Diante dessas observações, objetivou-se com o

presente trabalho, avaliar o efeito alelopático de extrato aquoso de folhas dos maracujazeiros *Passiflora mucronata* Lam. (maracujá-de-restinga) e *Passiflora edulis Sims* (maracujá roxo) na germinação e crescimento de sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface).

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Análise de Sementes no campus do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAE-UFES). Foram utilizadas folhas de espécies de maracujazeiro, *Passiflora mucronata* Lam. (maracujá-de-restinga) e *Passiflora edulis Sims* (maracujá roxo) na germinação e crescimento de sementes e plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface).

As folhas das espécies de maracujazeiros foram secas em estufa a 60 °C por 48 horas e posteriormente trituradas e o extrato aquoso obtido com 30 g de folhas colocadas em 300 mL de água destilada aquecida a 100 ºC, e mantidas em repouso por 10 minutos foi diluído em água destilada para obter as seguintes concentrações: 100; 50; 25 e 12,5 mg/mL^{-1}, e a água destilada foi utilizada como controle negativo e o herbicida comercial glifosato 1% como controle positivo.

O bioensaio de fitotoxicidade foi realizado com vinte e cinco sementes de alface, colocadas em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo papel filtro umedecido com 3 mL de solução. Os experimentos seguiram um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por concentração. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico transparente e mantidas úmidas em uma câmara de germinação do tipo demanda bioquímica de oxigênio (BOD) em temperatura ambiente (24 ± 2 ° C) durante todo o período do experimento. A porcentagem de germinação (%G) e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foram avaliados de 8 em 8 h durante 48 h. Os outros parâmetros macroscópicos avaliados foram o comprimento da raiz (CR) após 48 h e o comprimento aéreo (CA) após 120 h.

Para a análise de citotoxicidade, 10 raízes de cada tratamento foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1), coradas com orceína 2% e colocadas em lâminas cobertas por lamínulas para serem analisadas em microscópio. Para a realização da análise microscópica, 4000 células meristemáticas foram analisadas por tratamento, sendo observadas e quantificadas as diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas (AC) e nucleares (NA). O índice mitótico (IM) foi obtido pelo quociente do número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase).

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software R (R Core Team, 2023).

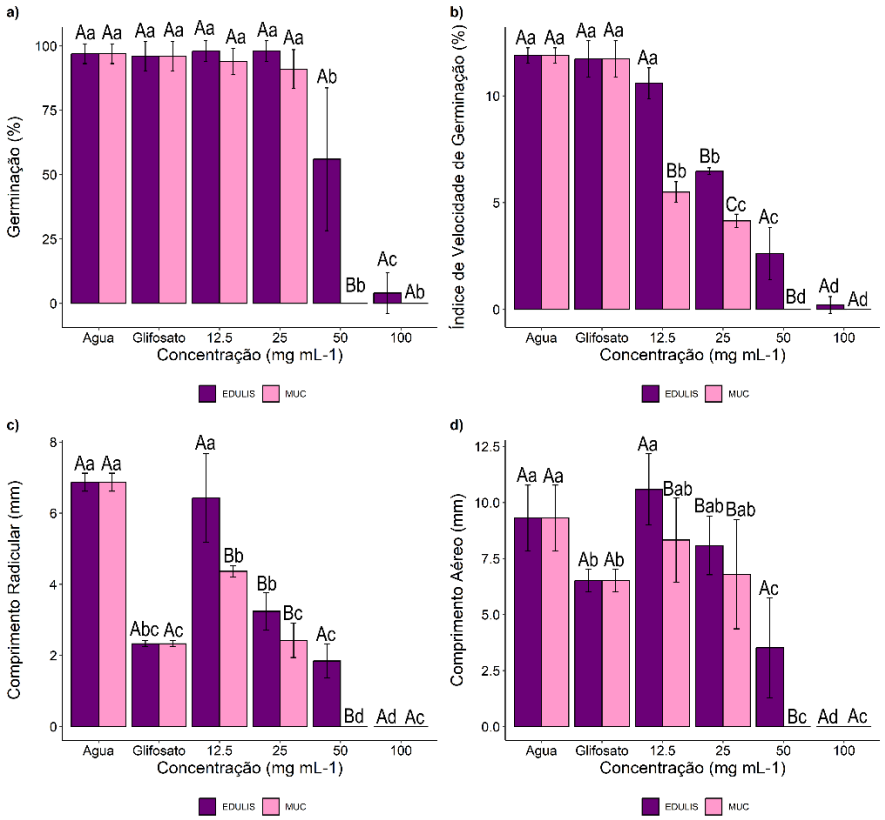
Resultados

Nos ensaios macroscópicos foi possível analisar a %G, o IVG, o CR e o CA, comparando-os com o controle positivo (glifosato) e com o controle negativo (água) e entre genótipos cujos resultados estão representados na Figura 1.

As sementes de alface tratadas com a maior concentração (100 mg/mL^{-1}) do extrato aquoso de *P. edulis* diferiram significativamente das demais concentrações e controles. As sementes submetidas às maiores concentrações (50 mg/mL^{-1} e 100 mg/mL^{-1}) do extrato de *P. mucronata* não germinaram, indicando efeitos alelopáticos (Figura 1a).

O vigor das sementes, medido pelo IVG, diminuiu à medida que as concentrações dos extratos aumentaram, especialmente para *P. mucronata*, com diferenças significativas entre todos os tratamentos e controles (Figura 1b). As sementes de alface tratadas com 100 mg/mL^{-1} e 50 mg/mL^{-1} de *P. edulis*, e 100 mg/mL^{-1} de *P. mucronata*, não apresentaram crescimento radicular devido à falta de germinação. Tanto o CR quanto o CA (Figuras 1c e 1d) reduziram com o aumento das concentrações, mostrando efeitos aleloquímicos semelhantes aos do glifosato.

Figura 1- Efeito do extrato aquoso na germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e crescimento aéreo em *Lactuca sativa.*



Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os genótipos e os controles; Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações e os controles, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: elaborado pelos autores.

A análise dos parâmetros de divisão celular revelou que os extratos de *P. edulis* e *P. mucronata* têm efeito citotóxico, reduzindo o Índice Mitótico (IM) conforme aumentam as concentrações do extrato. Na maior concentração, o IM foi menor que o observado para o herbicida glifosato, indicando um efeito citotóxico mais forte.

A Tabela 1 mostra que, com o extrato de *P. edulis*, o IM diminuiu significativamente nas concentrações mais altas, sugerindo que o extrato afeta o ciclo celular, causando efeitos aneugênicos e clastogênicos, que resultam em maiores alterações nucleares.

Tabela 1- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Passiflora edulis Sims* nos parâmetros de divisões mitóticas e índice mitótico da raiz meristemática de *Lactuca sativa*.

Concentrações (mg/mL^{-1})	IM	AC	AN	Aderente	C-metáfase	Perdido	Ponte	Multipolar
Água (C-)	11.125a	0.325ab	0.775a	0.9625ab	1.0725a	0a	1.0775a	0a
Glifosato (C+)	2.75bc	0b	3.75a	0b	0a	0a	0a	0a
12.5	6.475a	0.35ab	0.925a	1.575ab	1.46a	1.3a	1.785a	0.385a
25	7.35ab	0.525a	1.225a	3.0525a	3.0025a	0.3975a	0.995a	0a

50	9.725a	0.5a	2.575a	1.1375ab	2.1775a	0.605a	1.875a	0a
100	0a	0b	0a	0b	0a	0a	0a	0a

Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (p > 0,05). IM: índice mitótico. CA: alterações cromossômicas. NA: alterações nucleares. Fonte: elaborado pelos autores.

A Tabela 2 demonstra que o extrato de *P. mucronata*, nas concentrações de 50 mg/mL^{-1} e 100 mg/mL^{-1}, inibiu completamente a germinação, evidenciando forte ação alelopática. O IM foi maior no controle negativo e nas menores concentrações (12,5 mg/mL^{-1} e 25 mg/mL^{-1}) em comparação aos outros tratamentos. O número médio de alterações cromossômicas (AC) foi maior no controle negativo do que nos outros tratamentos, enquanto as alterações nucleares (AN) foram mais frequentes na concentração de 12,5 mg/mL^{-1}, sem diferença significativa em relação à concentração de 25 mg/mL^{-1} e ao controle negativo, mas com diferença significativa em relação ao controle positivo.

Tabela 2- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Passiflora mucronata* nos parâmetros de divisões mitóticas e índice mitótico da raiz meristemática de *Lactuca sativa*.

Concentrações (mg/mL^{-1})	**IM**	**AC**	**AN**	**Aderente**	**C-metáfase**	**Perdido**	**Ponte**
Água (C-)	11.125a	0.325a	0.775b	0.9625a	1.0725a	0b	1.0775a
Glifosato (C+)	2.75bc	0a	3.75a	0a	0a	0b	0a
12.5	8ab	0.75a	0.15b	1.18a	5.7125a	2.1375a	0.58a
25	9.1a	0.75a	0b	1.98a	5.315a	0.82ab	0.635a
50	0c	0a	0b	0a	0a	0b	0a
100	0c	0b	0b	0a	0a	0b	0a

Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (p > 0,05). Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água. Médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao glifosato. IM: índice mitótico. CA: alterações cromossômicas. NA: alterações nucleares. Fonte: elaborado pelos autores.

Nas análises de citotoxicidade foram utilizados ensaios microscópicos para possíveis avaliações, destacando-se as alterações cromossômicas (AC) e as alterações nucleares (AN), como também as frequências de cada tipo de AC, no qual, foram observados cromossomos aderentes, cromossomos perdidos, pontes cromossômicas, c-metáfases e cromossomo multipolar (Figura 2).

Figura 2- Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas aos extratos aquosos de *Passiflora edulis Sims* e *Passiflora mucronata* Lam.

a) metáfase normal, b) metáfase com aderência cromossômica, c) metáfase com cromossomo perdido, d) c-metáfase, e) anáfase, f) anáfase multipolar, g) anáfase com ponte e h) telófase. Fonte: elaborado pelos autores.

Discussão

Os resultados indicaram um efeito inibitório na germinação e crescimento das plântulas na espécie receptora, especialmente nas concentrações mais altas dos extratos aquosos de maracujazeiro. Isso sugere que esses extratos podem conter substâncias fitotóxicas com atividade alelopática. O bioensaio mostrou que a germinação das sementes foi mais sensível às concentrações mais altas, resultando em inibição total (100%) da germinação. Os aleloquímicos presentes nos extratos afetaram especialmente o crescimento radicular, conforme observado em outros estudos (Baličević *et al*., 2014b; Konstantinović et al., 2014), com maior impacto na raiz primária devido ao maior contato com o extrato (Maraschin *et al*., 2005).

Costalonga e Batitucci (2014) testaram a alelopatia usando folhas de *Passiflora edulis* em sementes de *Allium cepa* (cebola) e observaram que essa espécie de maracujá interferia no ciclo celular das sementes de cebola, causando diminuição do índice mitótico (IM) e inibição da germinação.

O IM foi utilizado como parâmetro de citotoxicidade, indicando que o bloqueio da divisão mitótica e a morte do núcleo resultam em redução do mesmo, o que prejudica o crescimento da raiz (Andrade *et al*., 2010). Segundo Fernandes *et al*. (2007), a variação no IM permite determinar o nível de citotoxicidade de um composto.

As alterações cromossômicas sugerem que os extratos aquosos têm ação genotóxica, afetando a estrutura e/ou número de cromossomos. De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), aumentos na frequência de alterações cromossômicas (AC) indicam efeitos genotóxicos, enquanto a elevada ocorrência de alterações nucleares (AN) revela efeitos citotóxicos. Compostos clastogênicos causam quebras no DNA, enquanto compostos aneugênicos interferem no fuso mitótico, resultando em erros na segregação cromossômica e formação de células poliploides (Fernandes *et al*., 2007).

No estudo, a concentração de 12,5 mg/mL^{-1} de *P. edulis* mostrou anáfase multipolar, causada por mau funcionamento do fuso mitótico, que leva à distribuição irregular dos cromossomos em mais de dois polos celulares (Rank e Nielsen, 1997). Foi observada alta incidência de células com aderência cromossômica, c-metáfases e pontes cromossômicas em todos os tratamentos. As pontes cromossômicas, resultantes de aderências, podem persistir até a telófase e causar fragmentações cromossômicas quando decorrentes de rearranjos estruturais (Giacomelli, 1999).

Conclusão

A concentração do extrato aquoso em 100 mg/mL^{-1} das folhas de *P. adulis* possui efeitos alelopáticos sobre a germinação das sementes e desenvolvimento inicial das plântulas de alface. Os extratos das folhas de *P. mucronata*, nas concentrações de 50 mg/mL^{-1} e 100 mg/mL^{-1}, apresentaram efeitos semelhantes ao glifosato, inibindo a germinação das sementes.

Os extratos aquosos apresentam modos de ação aneugênico e clastogênico, assim como nos ensaios de germinação e crescimento, que foi possível observar diferenças na sensibilidade da espécie modelo aos tratamentos.

Dessa forma, este estudo se torna um passo inicial importante para compreender o mecanismo de ação dos extratos aquosos de espécies de *Passiflora*, e se os mesmo terão efeitos significativos em plantas daninhas. Bioensaios complementares precisam ser realizados para responder a estas questões.

Referências

ANDRADE, L. F. et al. 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 Journal**, v. 73, n.11, p. 626-663, 2010.

BALIČEVIĆ, R. et al. Allelopathic effect of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) water extracts on germination and initial growth of maize. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1844-1848, 2014.

BHADORIA, P. Allelopathy: a natural way towards weed management. **Am. J. Exp. Agric**. v. 1, p. 7–20, 2011.

COSTALONGA, S. A.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação de efeitos mutagênicos de tintura de *Passiflora edulis* Sims (maracujá) no sistema-teste *Allium cepa*. Revista **Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, p. 329-337, 2014.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J.; PEIXOTO, J.R., COSTA, A.M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro:** histórico e perspectivas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 36 p. (Documentos/Embrapa Cerrados Nº 307).

FERNANDES, T. C. C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol**. v. 88, p. 252–259, 2007.

GIACOMELLI, F. R. B. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul, **Tese (Mestrado em Genética), Universidade Estadual de Maringá**, Brasil, p.1-131, 1999.

INDERJIT; NILSEN, E. T. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. **Crit. Rev. Plant Sci**. v. 22, p. 221–238, 2003.

KONSTANTINOVIĆ, B. et al. Allelopathic effect of weed species *Amaranthus retroflexus* L. on maize seed germination. **Romanian Agricultural Reserach**, v. 31, p. 315- 321, 2014.

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

MACIAS, F. A. et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biol. Sci. Space**, v. 17, p.18–23, 2003. doi: 10.2187/bss.17.18

MARASCHIN, F. S.; AQUILA, M. E. A. Contribution to the study of native species allelopathic potential. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 547-555, 2005.

PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, n. 1-3, p. 114-125, 2006.

PAWLOWSKI, A. et al. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South Afric. J. Bot**. v. 80, p. 96–103, 2012.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromossome aberration assay on N-methyl-N-Nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfone, **Mutat. Res.** v. 390, p. 121 -127, 1997.

TEERARAK, M. et al. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5677–5684, 2010.

ZENG, R. “Allelopathy in Chinese ancient and modern agriculture,” in Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry, eds R. Zeng, A. Mallik and S. Luo. **New York: Springer New York Press**, p. 39–59, 2008.

ZENG, R. S. Allelopathy—the solution is indirect. J. **Chem. Ecol**. v, 40, p. 515–516, 2014.