

Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface

PAULA, C.S.¹; CANTELI, V.C.D.¹; SILVA, C.B.¹; MIGUEL, O.G.¹; MIGUEL, M.D.¹

¹Departamento de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Av. Pref. Lothário Meissner, 3400, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil. *Autor para correspondência: crisspaula@onda.com.br

RESUMO: Este trabalho visou avaliar a ação fitotóxica de extrato e frações obtidas das folhas de *Bauhinia unguolata* L sobre a divisão celular e atividade das enzimas α -amilase, catalase, peroxidase e polifenoloxidase em plântulas de alface (*Lactuca sativa*, var *Grand rapis*). Sementes de alface foram expostas às concentrações de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato de *Bauhinia unguolata* e frações do mesmo, em condições ambientais controladas. Após três dias de protusão radicular, as raízes das plântulas foram cortadas e submetidas a preparo específico para visualização e contagem do número de células em cada fase mitótica. No sétimo dia, as amostras foram submetidas à avaliação da atividade enzimática utilizando técnica específica para cada enzima e leitura espectrofotométrica. Na análise da divisão celular observou-se que houve redução no número de células em mitose nas raízes das plântulas testadas, e a fração acetato de etila apresentou maior efeito inibitório sobre a divisão celular. O efeito sobre as enzimas que demonstram alterações no sistema de defesa antioxidante de *L. sativa* mostram que o extrato bruto e frações alteraram a produção das enzimas α -amilase, peroxidase, catalase e polifenol oxidase em, ao menos, uma das concentrações testadas, sendo um indicativo de estresse que interfere na divisão celular. Os resultados obtidos apontam para a presença de compostos com atividade inibidora ou estimulatória nas folhas de *B. unguolata* revelando potencial fitotóxico sobre as plântulas de alface.

Palavras-chave: *Bauhinia unguolata*, catalase, peroxidase.

ABSTRACT: Study of phytotoxic potential of extracts of *Bauhinia unguolata* L. on cell division and enzyme activity in lettuce seedlings. The aim of this study was to evaluate the phytotoxic action of extract and fractions obtained from the leaves of *Bauhinia unguolata* L. in bioassay laboratory, assessing their interference on cell division and activity of the enzymes α -amylase, catalase, peroxidase and polyphenol oxidase of *Lactuca sativa* (lettuce). The lettuce seeds were exposed to concentrations of 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the extracts and fractions of *Bauhinia unguolata* under controlled environmental conditions. After three days of root radicle protrusion, the plants' roots were cut and subjected to specific preparation for visualization and counting of the number of cells in each mitotic stage. On the seventh day the samples were subjected to enzymatic activity using specific technique for each enzyme and spectrophotometer measure. In the analysis of the mitotic index it was observed that there was reduction in the number of cells in mitosis in the roots of the plants tested and that the ethyl acetate fraction significantly affected the cell division. The effect on the enzymes that showed changes in the antioxidant defense system of *Lactuca sativa* indicate that the crude extract and the fractions altered the production of α -amylase, peroxides, catalase and polyphenol enzymes in at least one of the tested concentrations, representing an indication of stress, which interferes in the cell division. The obtained results point out the presence of compounds with inhibitory or stimulatory activity on plant leaves of *B. unguolata*, revealing phytotoxic potential to lettuce seedlings.

Keywords: *Bauhinia unguolata*, catalase, peroxidase.

INTRODUÇÃO

A *Bauhinia unguolata* L. é uma leguminosa nativa do Brasil conhecida como pata de vaca ou mororó (Maia Neto, 2008) encontrada principalmente nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste. Pouco estudada, a literatura reporta o uso da *B. unguolata* por índios Tapebas e por parte da população do Ceará, por sua ação hipoglicemiante no tratamento do diabetes (Moraes et al., 2005).

Estudos realizados com plantas do gênero *Bauhinia* mostraram influências destas sobre a germinação e o desenvolvimento das espécies-alvo utilizadas (Mourão Júnior & Souza Filho, 2010). A fitotoxicidade dos extratos de plantas é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição, produtos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo o processo germinativo bem como o processo de divisão celular, permeabilidade de membranas e na cinética enzimática (Mauli et al. 2009; Pergo & Ishi Iwamoto, 2011).

Estudos que avaliam o potencial fitotóxico de uma espécie podem fornecer informações iniciais sobre estratégias alternativas para manejo de plantas daninhas, explorando a biodiversidade, com a obtenção de produtos naturais que podem reduzir a dependência aos herbicidas tradicionais. Além de contribuir para o aumento da produtividade agrícola, alguns autores sugerem que estes compostos com atividade fitotóxica podem ser mais seletivos, biodegradáveis e menos poluentes que os herbicidas tradicionais (Macías et al., 2000). Bioensaios preliminares realizados em laboratório avaliando o potencial fitotóxico destes compostos sobre espécies comerciais, como *Lactuca sativa* (alface), vêm sendo realizados (Trevisan et al., 2012; Paula et al., 2014; Rial et al., 2014; Kato-Noguchi et al., 2014; Wang et al., 2014). As vantagens da utilização da alface nestes; experimentos são a homogeneidade genética, germinação uniforme e fácil disponibilidade, ao contrário das espécies silvestres que são geneticamente mais heterogêneas e apresentam variada sensibilidade, além de falta de homogeneidade na germinação (Macías et al., 2000; Trevisan et al., 2012).

Grande parte dos estudos refere-se apenas ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste sem levar em consideração eventos celulares ou alterações fisiológicas. Neste contexto, este estudo teve como objetivos verificar a presença de efeito fitotóxico do extrato etanólico e das frações do mesmo, produzidos a partir de folhas de *Bauhinia unguolata* L. sobre o índice de mitoses em células meristemáticas das raízes e alteração na produção das enzimas alfa amilase, peroxidase, catalase e polifenoloxidase.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Bauhinia unguolata* L. foram coletadas em janeiro de 2007 na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, coordenadas geográficas 20°30'37,5" S e 54°36'46,6" W, 545m. A identificação foi realizada por um especialista na área com exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS sob o número CGMS 19754, e autorização do IBAMA para acesso ao Patrimônio Genético nº 02001.001165/2013-47.

O material vegetal foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho de facas/martelo. O extrato bruto foi obtido a partir de 1,5 kg deste material em etanol, com a utilização de aparelho de Soxhlet e posteriormente utilizado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido utilizando solventes com polaridade crescente: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. A partir do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FCL), fração acetato de etila (FAE) e fração hidro alcoólica residual (FR), foram realizados os ensaios propostos.

Em placas de petri contendo papel de filtro, foram adicionados 5,0 mL das soluções EEB e frações preparadas em quadruplicatas nas concentrações de 250 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 1000 µg.mL⁻¹ 5,0 mL, e água destilada em placas identificadas como controle negativo. Na sequência foram adicionadas em cada placa cinquenta sementes de alface (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids) que permaneceram em contato com a solução durante todo período do experimento assim como as soluções. As placas foram mantidas em câmara de germinação (BOD) em condições de luz (160 W), umidade relativa (± 80%) e temperatura constante (25° C) por sete dias para germinação e crescimento.

No terceiro dia após a protusão radicular, segmentos de dois centímetros a partir da extremidade distal das radículas de três amostras de cada placa foram retirados, e colocadas em 5 mL de solução de Farmer (3:1 etanol; ácido acético glacial) por 2 horas, a 25°C, com posterior transferência para uma solução de álcool 70%. Para determinar interferência na divisão celular as pontas das raízes foram tratadas sequencialmente com água destilada por 5 minutos; ácido clorídrico 1M por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, novo tratamento com água destilada por 5 minutos e orceína acética 2% por 30 minutos. As pontas das raízes tiveram o ápice, 2,0mm iniciais, cortados sobre lâmina de microscópio e pressionando sob lamínula para esmagamento e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio óptico comum (aumento

de 1000X) contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento, foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos por lâmina. Os resultados são apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição de atividade mitótica (Macías et al., 2000).

Para avaliação da atividade enzimática, ao final do período determinado para germinação e crescimento, foi preparado o extrato enzimático. As plântulas foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido com posterior adição de 10 mL e tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7) e submetidas a centrifugação (2500 rpm por 20 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e constituindo o extrato enzimático (Putter, 1974). Este extrato enzimático foi mantido em freezer em temperatura de 4°C, e utilizado para as dosagens das enzimas, conforme metodologias específicas a seguir.

No ensaio de atividade da α -amilase, 400 μ L dos extratos enzimáticos foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho-maria (70°C durante 20 minutos) (AOAC, 1965) com posterior adição de 0,5 mL de tampão acetato (1,0 M, pH 7) e 1,0 mL de solução de amido a 1%, sendo então incubados a 30°C (5 minutos). Após este período, foi adicionado 0,5 mL de solução de Lugol 50% e 1 mL de água destilada, e em seguida, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 620 nm. As absorbâncias foram calculadas segundo a AOAC (1965), segundo a equação:

$$AT = [(substrato \text{ a } 620 \text{ nm} - \text{leitura } 620 \text{ nm}) / 5 \text{ min} \times A] \times (20 \text{ min} / 0,5 \text{ min} \times 0,5 \text{ g de massa fresca}),$$

em que:

AT = Atividade Total da enzima α -amilase;

$$\text{Atividade da catalase } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \frac{\text{vol de incubação} \times \alpha \text{ tg } (\text{min}^{-1})}{\text{Coeficiente de extinção molar da enzima } (\epsilon)}$$

(α tg) = $\Delta A / \Delta t$; sendo:

α tg = variação da tangente

ΔA = a variação da absorbância e

Δt = a variação do tempo (minutos).

A atividade da polifenoloxidase foi determinada com adição de 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 6,0) e 0,5 mL de catecol 0,1 M, a 1 mL do extrato enzimático e incubação a 30°C (30 minutos) com posterior transferência

substrato a 620 nm = controle negativo (tampão acetato, solução de amido a 1% e solução de lugol a 50%);

leitura 620 nm = extrato enzimático (tampão acetato, solução de amido a 1% e solução de lugol a 50%
A = 1 μ g de amido.

Os dados foram expressos em μ g de amido hidrolizado min^{-1} por g de material fresco⁻¹.

A atividade da peroxidase foi avaliada com adição de 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,2M; pH 7,0) a 1 mL dos extratos enzimáticos, mantidos em banho-maria a 25°C. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de guaiacol (0,5%) e 500 μ L de peróxido de hidrogênio (0,08%), sendo imediatamente realizada a leitura de absorbância a 470 nm (Putter, 1974).

Para o cálculo da atividade enzimática, U. mL^{-1} , foi empregada a equação:

$$U.\text{min}^{-1} = (A / \epsilon) \times (1 / V_e) \times FD \times (1/t) \times 1000$$

em que:

U. min^{-1} = unidade de atividade por mL;

A = absorbância;

ϵ = absortividade molar do tetraguaiacol (26.600 $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ou absortividade do catecol (26.900 $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

V_e = volume da solução de enzima utilizada no ensaio (mL);

FD = fator de diluição (diluição do extrato bruto enzimático) e;

t = tempo de reação em minutos

A atividade da catalase foi determinada com adição de 3 mL de peróxido de hidrogênio (12,5 mM) em água destilada a 100 μ L de extrato enzimático a 30°C. A atividade da catalase foi determinada pela medição da redução na absorbância das amostras a 240 nm, em consequência do consumo de H_2O_2 , usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e calculada segundo a fórmula (Bracht et al., 2003):

para um banho de gelo. A esta se adicionou 0,5 mL de ácido perclórico 1,4%, deixando-se em repouso por 10 minutos e posterior leitura a 395 nm (Duangmal & Apenten, 1999). A atividade da enzima polifenoloxidase foi calculada usando a mesma equação para o cálculo da atividade da peroxidase, citada anteriormente (Putter, 1974; Duangmal & Apenten, 1999; Zeraik et al., 2008):

Para cada amostra avaliada, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com

quatro tratamentos (controle em água destilada e 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das amostras) em três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR. As médias obtidas foram

calculadas em porcentual em relação ao controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento que avalia a interferência do extrato e frações sobre a

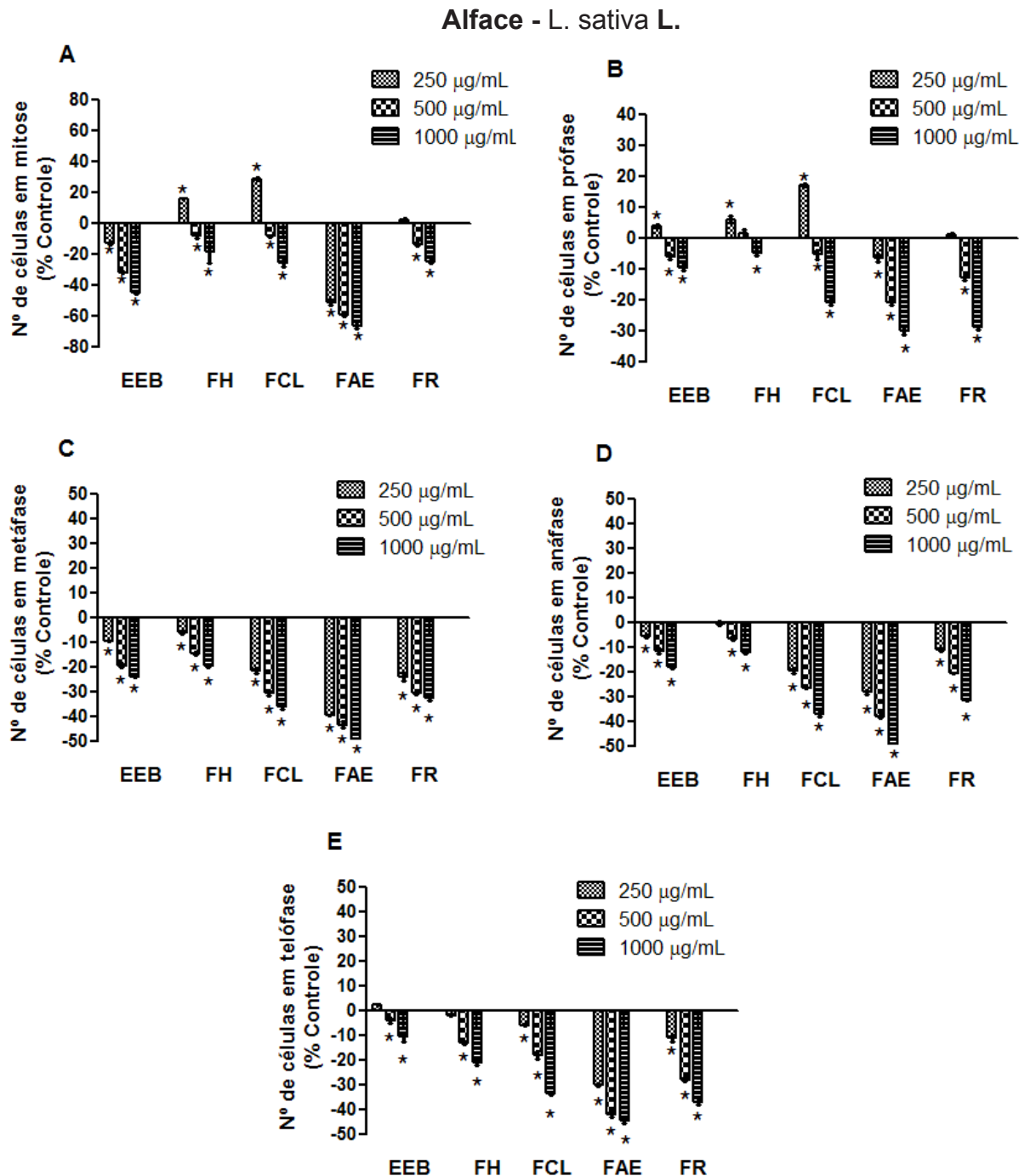


FIGURA 1. Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plântulas de alface, expostas a diferentes concentrações do extrato bruto (EEB), a fração hexânica (FH), clorofórmica (FCL), fração acetato de etila (FAE) e fração hidroalcoólica remanescente (FR) obtidas de *Bauhinia unguolata* L. Dados expressos em percentual em relação ao controle. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

divisão celular são ilustrados na Figura 1 A-D. O aumento da concentração do extrato e frações gerou maior ação inibitória sobre a atividade mitótica, sendo mais expressivo sob influência da fração FAE (Figura 1-A).

A fração FAE (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) gerou uma taxa de inibição de 51,9% das células em anáfase (Figura 1-D), 50,1% em metáfase (Figura 1-C), 44,4% em telófase (Figura 1-E) e 30,1% em prófase (Figura 1-B) em relação as células das plântulas do controle. Efeitos estimulatórios foram observados sobre a prófase nas menores concentrações do EEB e frações FH, FCL e FR. O predomínio de efeitos inibitórios sobre as diferentes fases da mitose em células meristemáticas nas raízes das plântulas de alface levam a uma diminuição no crescimento, tendo em vista que esta região meristemática é a responsável pela produção de novas células e está estreitamente relacionada com o crescimento das raízes (Adam & El-Ashry, 2010).

Com relação à alterações na divisão celular, foi observado que a concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da FH e FCL estimularam a divisão celular em raízes de alface. As concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dessas frações, o EEB, FAE e FR diminuíram o número de células em divisão, sendo que a FAE foi a fração que provocou um maior efeito inibitório quando comparado ao controle (Figura 1 A). O mesmo efeito foi observado nas células em prófase para o EEB, FH e FCL, causando um estímulo nessa fase da divisão celular. As demais frações inibiram o número de células em prófase quando comparadas ao controle, com acentuada atividade para a concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da FAE e FR (Figura 1 B).

O aumento do número de células em mitose pode ser atribuído à redução da toxicidade e citotoxicidade (González et al., 2011). Por outro lado, alterações na divisão celular observadas principalmente na prófase, podem ser prejudiciais às células, pois podem levar a proliferação celular desordenada e formação de calos em raízes (Leme & Marin-Morales, 2009).

O EEB e frações reduziram o número de células em metáfase, anáfase e telófase com efeitos inibitórios mais acentuados para a FAE. Efeitos de estímulo não foram observados nessa fase de diferenciação celular (Figura 1 C, D e E). O crescimento celular depende de um processo normal da mitose (Ding et al., 2010). A divisão uniforme de todos os componentes celulares permite um crescimento equilibrado para o organismo (Reigosa et al., 2006). O controle da progressão do ciclo celular e o número de células em divisão definem o crescimento e morfogenese da planta, e qualquer alteração no tempo e ordem desses eventos, irá atuar como um fator crítico no seu

desenvolvimento (Reigosa et al., 2006). Assim, as respostas observadas tanto para estímulo quanto inibição podem estar relacionadas à concentração necessária para causar fitotoxicidade. Neste contexto, Reigosa et al. (1999) relataram que os efeitos dos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos de uma planta são dependentes da concentração, ou ao menos se espera que sejam, promovendo ativações em baixas concentrações e inibições em altas concentrações.

Os flavonoides quercetina, quercetina-3-Oarabinofuranosídeo e quercitrina foram isolados das folhas da *Bauhinia unguolata* (Maia Neto et al., 2008), e a atividade fitotóxica deste grupo de metabólitos secundários já foi reportada na literatura (Melos et al., 2007, Almeida et al., 2008). Assim é esperado que estes flavonoides possam estar presentes na FAE, e desta forma é possível supor que tais efeitos do extrato e frações observados nos experimentos se devam em grande parte a estas substâncias. Estes compostos podem ser responsáveis, isolado ou sinergicamente, pela interferência nos processos fisiológicos durante a fase de desenvolvimento das espécies-alvo em estudo (Einhellig, 1986).

Nos ensaios enzimáticos (Tabela 1), foi observado que os extratos e frações aumentaram o conteúdo de α -amilase em *L. sativa*. O EEB e FH provocaram considerável aumento na atividade desta enzima quando comparada as demais frações.

Somente a FAE 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não promoveram aumento da atividade enzimática, apresentando resultados semelhantes ao controle. A α -amilase é uma enzima hidrolítica sintetizada durante as primeiras fases da germinação, responsável pela conversão do amido em açúcares utilizados especialmente para o crescimento da plântula (Carvalho & Nakagawa, 1988). O aumento da atividade desta enzima pode estar relacionado a um aumento de gasto energético por parte das células para a defesa da espécie alvo frente a um agente agressor (Jacobsen et al., 1986).

Na avaliação da atividade das peroxidases foram observados estímulo e inibição com as amostras obtidas de *B. unguolata*. As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina (Viecelli et al., 2010), e estão relacionadas a eventos que envolvem indução de resistência ou adaptação frente a condições adversas que geram estresse (Cavalcanti et al., 2005), ou seja, é uma proteção antioxidativa. Apesar disso, não é observado um comportamento padrão (Cavalcanti et al., 2005), pois depende do tipo de indutor, concentração, tempo após a sua aplicação na planta e patossistema em estudo. Viecelli (2010) também observou redução na atividade de peroxidases em feijoeiro tratado com

TABELA 1. Atividade enzimática de *L. sativa* (alface) frente ao extrato bruto etanólico e frações obtidas de folhas de *B. unguolata* L.

Amostra	α -AMILASE (μg de amido hidrolizado min^{-1} por g de material fresco ⁻¹)			PEROXIDASE ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
EEB	40,45 \pm 0,77 ^k	34,85 \pm 1,29 ^j	31,01 \pm 1,27 ⁱ	0,02 \pm 0,02 ^a	0,02 \pm 0,02 ^a	0,03 \pm 0,02 ^a
FH	28,07 \pm 1,06 ^h	27,85 \pm 1,11 ^h	25,87 \pm 1,27 ^h	0,23 \pm 0,01 ^{fg}	0,16 \pm 0,02 ^{de}	0,08 \pm 0,01 ^b
FCL	19,07 \pm 0,26 ^f	22,05 \pm 0,70 ^g	10,65 \pm 1,23 ^{cd}	0,23 \pm 0,02 ^{fg}	0,13 \pm 0,01 ^{cd}	0,03 \pm 0,006 ^a
FAE	14,20 \pm 0,87 ^e	4,93 \pm 0,27 ^a	6,91 \pm 0,50 ^{ab}	0,12 \pm 0,01 ^{cd}	0,02 \pm 0,01 ^a	0,24 \pm 0,01 ^g
FR	11,27 \pm 0,60 ^{cd}	8,40 \pm 0,07 ^{bc}	12,87 \pm 1,80 ^{de}	0,19 \pm 0,01 ^{ef}	0,02 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,02 ^{bc}
Controle	4,13 \pm 0,40 ^a	4,13 \pm 0,40 ^a	4,13 \pm 0,40 ^a	0,09 \pm 0,01 ^{bc}	0,09 \pm 0,01 ^{bc}	0,09 \pm 0,01 ^{bc}

Amostra	CATALASE ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de material fresco)			POLIFENOL OXIDASE ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
EEB	0,12 \pm 0,01 ^{cd}	0,32 \pm 0,04 ^f	0,30 \pm 0,02 ^f	5,58 \pm 0,24 ^{ab}	11,2 \pm 0,43 ^g	9,72 \pm 0,21 ^{def}
FH	0,25 \pm 0,01 ^{ef}	0,15 \pm 0,02 ^{cde}	0,15 \pm 0,03 ^{cde}	13,15 \pm 1,93 ^g	10,74 \pm 1,05 ^{ef}	7,99 \pm 0,46 ^{acd}
FCL	0,24 \pm 0,07 ^{ef}	0,11 \pm 0,02 ^{cd}	0,07 \pm 0,04 ^{bc}	16,29 \pm 0,15 ^h	8,54 \pm 0,38 ^{cd}	8,76 \pm 0,31 ^{cde}
FAE	0,01 \pm 0,02 ^{ab}	0,11 \pm 0,03 ^{cd}	0,16 \pm 0,02 ^{cde}	4,86 \pm 0,27 ^a	5,14 \pm 0,10 ^a	9,4 \pm 0,34 ^{cdef}
FR	0,13 \pm 0,01 ^{cd}	0,09 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,02 ^{cd}	7,32 \pm 1,14 ^{bc}	4,08 \pm 0,22 ^a	4,50 \pm 0,40 ^a
Controle	0,18 \pm 0,05 ^{de}	0,18 \pm 0,054 ^e	0,18 \pm 0,05 ^{de}	7,72 \pm 0,71 ^{cd}	7,72 \pm 0,71 ^{cd}	7,72 \pm 0,71 ^{cd}

Extrato Etanólico Bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FCL); fração acetato de etila (FAE) e fração hidroalcoólica remanescente (FR). Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

extrato aquoso de *Pycnoporus sanguineus* a 10% e inoculado com *Pseudocercospora griseola* (patógeno causador da Mancha Angular). O mesmo extrato, na concentração de 20%, incrementou a atividade de peroxidases no quarto dia após a inoculação, mas reduziu no quinto e sétimo dias. Esse comportamento oscilante na atividade de peroxidases também foi descrito por Baldo (2008) utilizando esses mesmos extratos aquosos em feijoeiro inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. No experimento realizado com *B. unguolata* registrou-se tanto efeitos estimulatório como inibitórios, dependendo da fração e concentração testada, mas não foi possível verificar se a mesma amostra apresentou os dois comportamentos tendo em vista que a avaliação foi realizada somente no sétimo dia após o início do crescimento.

Na avaliação da atividade da catalase houve estímulo na atividade enzimática sob ação do EEB nas duas maiores concentrações, e inibição com a FAE 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, FCL 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e FR 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As outras amostras foram estatisticamente semelhantes ao controle. A catalase está envolvida diretamente na remoção do peróxido de hidrogênio (Riedle-Bauer, 2000) e uma atividade aumentada

desta enzima, sugere maior proteção e eficiência.

O EEB e frações estimularam a produção da polifenol oxidase em alface, e o EEB (500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), FH (250 e 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e FCL (250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) causaram estímulo superior à FAE e FR. Um efeito inibitório foi observado para o EEB (250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), FAE (250 e 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), FR (500 e 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). A enzima polifenol oxidase é uma oxido-redutase responsável pela aparência escura de produtos agrícolas descascados e em mecanismos de defesa das plantas, sendo geralmente encontrada em maior atividade em tecidos infectados. A importância da atividade desta enzima na resistência a doenças é provavelmente devido à propriedade de oxidar compostos fenólicos, resultando em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação (Campos et al, 2004).

A produção de EROs pode ser estimulada pelos aleloquímicos por diversos mecanismos, e o aumento destas espécies leva principalmente a um aumento da atividade de peroxidases, catalase e polifenol oxidase, entre outras, provavelmente como defesa da planta contra ação fitotóxica destes compostos (Campos et al., 2004; Soares & Machado, 2007; Almeida et al., 2008). Nos

experimentos realizados é observado que nem todas as amostras promoveram ativação das enzimas.

Pode-se inferir que o extrato e frações obtidos das folhas de *Bauhinia unguolata* L. apresentam efeitos fitotóxico ao interferir na divisão celular com predomínio de efeitos inibitórios sobre as diferentes fases da mitose em células meristemáticas nas raízes das plântulas de alface que levam a diminuição do crescimento das mesmas.

Efeito inibitório expressivo sobre as diferentes fases da mitose foi observado com a FAE. Com relação à atividade enzimática houve predomínio de aumento da atividade para a alfa amilase. Estímulo, inibição ou nenhuma alteração com relação às atividades das peroxidases, catalases e polifenol oxidases foram observados dependendo da amostra e concentração.

Os resultados obtidos indicam potencial fitotóxico do extrato etanólico e das frações do mesmo, obtidos a partir de folhas de *B. unguolata*, devido à presença de compostos com atividade inibidora ou estimulatória sobre o índice de mitoses em células meristemáticas das raízes e na alteração da produção das enzimas alfa amilase, peroxidase, catalase e polifenol oxidase em plantas de alface.

AGRADECIMENTOS

A Capes pelo suporte financeiro e bolsas de doutorado, a Sra. Geциane Mirian da Silva pelo auxílio com a coleta do material e ao Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela identificação da espécie.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F.I.M; EL-ASHRY, Z.M. Evaluation of genotoxicity of 4-n-nonylphenol using *Vicia faba* L. **Journal of Biological Sciences**, v.10, n.4, p.368-372, 2010.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.
- ALMEIDA, G.D. et al. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista da Faculdade Nacional de Agronomia**, v.61, n.1, p.4237-4247, 2008.
- ANDERSON, M.D. et al. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.
- AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington: Editorial Board, 1965. 656p.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.
- BRACHT, A. et al. Enzimas. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de laboratório em Bioquímica**. v.1, Maringá: Manole, 2003. p.103-137.
- CAMPOS, A.D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Revista de Agropecuária Brasileira**, v.19, p.637-643, 2004.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.
- CAVALCANTI, L.S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.81-124.
- DING, L. et al. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the entkaurene diterpenoid rabdosin B. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, p.553–563, 2010.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. romano). **Food Chemistry**, v. 64, p. 351-359, 1999.
- EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A. R; TANG, C. H.-S. (ed.). **The Science of Allelopathy**. Nova York: John Wiley and Sons, 1986. p.171-188.
- GONZÁLEZ, P.S. et al. Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. **Environmental Science and Pollution Research**, v.18, n.1, p.482-491, 2011.
- JACOBSEN, J.V. et al. Water stress enhances expression of an alpha-amylase gene in barley leaves. **Plant Physiology**, v.80, p.350, 1986.
- KATO-NOGUCHI, H. et al. Phytotoxic substances with allelopathic activity may be central to the strong invasive potential of *Brachiaria brizantha*. **Journal of Plant Physiology**, v.171, n.7, p.525–530, 2014.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71-81, 2009.
- MACÍAS, F.A. et al. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2512-2521, 2000.
- MAIANETO, M. et al. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.227-229, 2008.
- MAULI, M. M. et al. Alelopatia de *Leucena* sobre soja e plantas invasoras. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, p.55-62, 2009.
- MELOS J.L.R.; HONDA N.K. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. ex. Willd (Pteridaceae). **Química Nova**, v.30, p.292-297, 2007.
- MORAIS, S.M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, p.169-177, 2005.
- MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A.P.S. Differences in Allelopathic Activity Patterns in Leguminosae. **Planta Daninha**, v.28, p.939-951, 2010.

- PAULA, C.S. et al. Atividade alelopática do extrato e frações das folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.1, p.47-52, 2014.
- PERGO, E.M., ISHII-IWAMOTO, E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v.37, p.500-513, 2011.
- PUTTER, J. Peroxidases. In Bergmeyer H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 2nd. Weinhan: Verlag Chemie, 1974, p.685-690.
- REIGOSA, M.J. et al. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, 1999. p.577-608.
- REIGOSA, M. J. et al. Cell cycle analyses for understanding growth inhibition, In: Reigosa, M.J.; Pedrol, N.; González, L. (Ed). **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. Netherlands: Springer, 2006, p.141-156.
- RIAL, C. et al. Phytotoxicity of Cardoon (*Cynara cardunculus*) Allelochemicals on Standard Target Species and Weeds. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.62, n.28, p.6699-6706, 2014.
- RIEDLE-BAUER, M. Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in Systemic Virus Infections of Plants. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.297-302, 2000.
- SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v.1, p.9 -18, 2007.
- TREVISAN, R.R. et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.494-499, 2012.
- VIECELLI, C.A. et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathology**, v.36, p.73-80, 2010.
- ZERAIK, A.E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, p.731-734, 2008.
- WANG, Q. et al. Allelopathic activity and chemical constituents of walnut (*Juglans regia*) leaf litter in walnut-winter vegetable agroforestry system. **Natural Product Research**, v.1, p.1-4, 2014.