

Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores

Clarissa de Souza Borges¹, Cristina Copstein Cuchiara¹, Sérgio Delmar dos Anjos e Silva²
e Vera Lucia Bobrowski¹

¹Laboratório de Genética, Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354, CEP 96010-900. E-mail: caiasb@hotmail.com

²Pesquisador CPACT (Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado), EMBRAPA, Pelotas, RS.

Resumo - Devido à ampla expansão do cultivo de mamona (*Ricinus communis* L.) e da sua utilização em larga escala para a produção de biodiesel e fertilizante, neste trabalho, procurou-se averiguar, por meio de ensaios biológicos, os efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de folhas frescas e folhas secas de mamona sobre sementes da alface e cebola. Os biotestes foram conduzidos em germinador (20 °C), com extrato aquoso obtido por trituração de folhas frescas e folhas secas nas concentrações de: 0, 5, 10, 20 e 40 mg mL⁻¹. Os testes de germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação (IVG), que avaliam efeito alelopático, foram feitos com quatro repetições de 100 sementes/concentração/bioteste. A determinação da citotoxicidade foi através do índice mitótico (IM), onde foram contadas, pela técnica de varredura, 2000 células/concentração/bioteste. Pode-se verificar que a ação do extrato de folhas frescas e secas de mamona provocou efeito alelopático e citotóxico sobre sementes de alface nas diferentes concentrações testadas. Porém sobre as sementes de cebola a ação do extrato de folhas frescas apresentou apenas efeito citotóxico com o aumento das concentrações testadas, já no bioensaio com extrato de folhas secas pode-se observar efeito alelopático e citotóxico crescente com o aumento das concentrações.

Palavras-chave: alelopatia, citogenética, germinação, mamona

Allelopathic and cytotoxic effects of aqueous extracts of *Ricinus communis* using different bioindicators

Abstract - Due to the wide expansion of the castor beans (*Ricinus communis* L.) cultivation and its use in biodiesel and fertilizer large-scale production, in this work, it was studied, through biological tests, the cytotoxic and allelopathic effects of aqueous extracts of fresh and dry leaves of castor bean on the seeds of lettuce and onion. The biotests were carried out in germinator (20 °C) with aqueous extract obtained by milling of the fresh and dried leaves at concentrations of 0, 5, 10, 20 and 40 mg mL⁻¹. The germination, first count and speed of germination index (IVG) tests, which evaluate allelopathic effect, were made with four replicates of 100 seeds/concentration/biotest. The cytotoxicity was determined by the mitotic index (IM), which were counted by scanning technique, 2000 cells/concentration/biotest. It has been verified that the action of fresh and dried extracts of castor bean leaves provoked allelopathic and cytotoxic effect on lettuce seeds in different tested concentrations. However, on the onion seeds the action of fresh and dried extracts of castor leaves showed only a cytotoxic effect with increasing different tested concentrations, in the bioassays with extracts of dried leaves it has been observed a rising allelopathic and cytotoxic effect with an increase in concentrations.

Keywords: allelopathy, cytogenetic, germination, castor bean

Introdução

O termo alelopatia define um fenômeno quimioecológico no qual metabólitos secundários produzidos por uma espécie vegetal são liberados e interferem na germinação e/ou no desenvolvimento de outras plantas num mesmo ambiente (Soares et al., 2002). De acordo com Rice (1984), a alelopatia se refere a qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra, pela produção de substâncias liberadas no ambiente. Os produtos do metabolismo secundário, embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (Santos, 2001).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática. Para que seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (Gabor & Veatch, 1981; Ferreira & Áquila, 2000).

A citotoxicidade de uma substância pode ser avaliada, respectivamente, através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (Souza et al., 2005).

A detecção de substâncias potencialmente citotóxicas e genotóxicas e seus prováveis efeitos nos organismos é importante no estudo do impacto que eles podem trazer. Uma boa alternativa no emprego de bioindicadores é a utilização de organismos fenotipicamente mais sensíveis a lesões no DNA e que expressem assim qualquer alteração externa a que são submetidos (Costa & Menk, 2000).

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma planta originária da Ásia meridional, mas atualmente apresenta uma ampla distribuição, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. É uma dicotiledônea pertencente à família *Euphorbiaceae*, caracterizada pela presença de sementes, ricas em óleo (48% a 50%), porém tóxicas devido principalmente a uma proteína, chamada ricina, já suas folhas apresentam uma menor concentração desta toxina (Ohara et al., 1995).

Seu cultivo no Brasil vem crescendo devido à grande importância desta na produção de biocombustível, além de outras formas de utilização, como por exemplo, em fertilizante e inseticida natural (Faria et al., 2010).

Cientes da ampla expansão do cultivo e da utilização em larga escala para a produção de biodiesel e fertilizante, neste trabalho, procurou-se averiguar, por meio de ensaios biológicos, os efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de folhas frescas e secas de mamona sobre sementes de alface e cebola.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas folhas de mamona do campo experimental da Embrapa Clima Temperado - CPACT, localizado no município de Pelotas, RS, na latitude 31°41'S e longitude 52°21'W e de altitude 60 m.

Os extratos de folhas frescas de mamona (*Ricinus communis* L.) foram obtidos através de trituração em liquidificador das mesmas, na proporção de 80 g de folhas para 160 mL de água destilada (AD). Posteriormente foi realizada a filtração, e o extrato bruto foi diluído de modo a obterem-se quatro concentrações diferentes dos extratos (5; 10; 20 e 40 mg mL⁻¹).

Já os extratos de folhas de mamona previamente secas em estufa a 50 °C durante 72h, foram obtidos por trituração em liquidificador na proporção 40 g de folhas em 200 mL de água destilada. A mistura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. Após, foram feitas diluições para obtenção de quatro concentrações diferentes do extrato (5; 10; 20 e 40 mg mL⁻¹).

Foram realizados quatro bioensaios, utilizando-se como bioindicadores sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar Rainha de Maio e de cebola (*Allium cepa* L.) cultivar Baía Periforme Precoce. São eles: sementes de alface germinadas em extrato aquoso de folhas frescas e extrato

aquoso de folhas secas, e sementes de cebola germinadas em extrato aquoso de folhas frescas e extrato aquoso de folhas secas.

Os bioensaios foram realizados em câmara de germinação com temperatura controlada de 20 °C. As sementes de alface e cebola foram acondicionadas em caixas gerbox forradas com papel germiteste umedecido com 10 mL das diferentes concentrações dos extratos e água destilada utilizada como controle. Foram utilizadas quatro repetições estatísticas de 100 sementes para cada concentração dos extratos testados e do controle, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Para avaliar a qualidade fisiológica foram realizadas contagens no intervalo de 24h até o sétimo dia, para a alface, e até o décimo segundo dia, para a cebola, obtendo-se assim o índice de velocidade de germinação (IVG). O teste de primeira contagem leva-se em consideração o número de sementes germinadas aos quatro dias para alface e aos seis dias para cebola, já o teste de germinação é o total de sementes geminadas ao final dos sete e doze dias para alface e cebola respectivamente, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Para a análise citogenética, foram realizados os testes de índice mitótico (IM) e presença ou ausência de aberrações cromossômicas. Na determinação do índice mitótico foi empregada a técnica de esmagamento (Guerra & Souza, 2002). Na qual após a protrusão da radícula, as raízes foram coletadas e fixadas em 3 partes de etanol :1 parte de ácido acético glacial P.A. (fixador Carnoy 3:1) permanecendo em temperatura ambiente por um período de 2 a 24h. Após este período foram armazenadas em freezer para posterior análise microscópica. Para a confecção de lâminas, as radículas sofreram o seguinte processo: permaneceram em água destilada durante 5 minutos, logo após foram hidrolisadas em HCl 5N sendo, o tempo de hidrolise para alface 7 minutos e para cebola 12 minutos, retornaram a água destilada por mais 5 minutos. Posteriormente, as radículas foram transferidas para lâmina onde, em microscópio estereoscópico foi retirada a coifa para a obtenção do meristema apical, adicionada orceína acética 2%, colocada uma lamínula sobre o material esmagado, e posteriormente aquecida.

As lâminas de cada bioindicador foram analisadas, pelo método de varredura, em microscopia óptica em dimensão de 400x, oito repetições de 250 células/lâmina, um total de 2000 células por tratamento. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observado e multiplicando-se por 100. Também se levou em consideração a presença ou ausência de aberrações cromossômicas em 250 células/lâminas, num total de 2000 células por tratamento.

Para análise de variabilidade dos dados, aplicou-se análise de variância utilizando o pacote estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984) e as médias de tratamentos (concentrações) foram comparadas pelo teste Duncan a 1%

Resultados e Discussão

Por meio dos resultados mostrados na Figura 1A, observamos que o IVG do extrato de folhas frescas sobre sementes de alface, não apresentou diferença significativa entre o controle e as concentrações mais baixas do extrato testado (5 e 10 mg mL⁻¹), mas a diferença foi altamente significativa entre o controle das duas concentrações mais elevadas (p<0,01). Resultados semelhantes foram obtidos por Borella & Pastorini (2009) na interferência de extratos aquosos de raízes de *Solanum americanum* sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete.

Podemos visualizar um efeito alelopático sobre as sementes de alface, pois o IVG foi diminuindo, com o aumento das concentrações utilizadas. Resultados semelhantes para IVG foram observados por outros autores, utilizando extrato de *Achyrocline satureioides* e outras plantas nativas (Maraschin-Silva & Aquila, 2006; Gatti et al., 2004), em que uma relação negativa entre o IVG e as concentrações de extrato vegetal foi obtida.

Já, os resultados do teste de primeira contagem e de germinação (Figura 1B e C), não apresentaram diferença estatística significativa nas concentrações testadas (p>0,01), comprovando assim que o efeito alelopático, freqüentemente, não se dá sobre a germinação, mas sobre a velocidade de germinação ou sobre outro parâmetro do processo (Ferreira & Aquila, 2000).

Na análise do IM para esse bioensaio observou-se que o controle não diferiu estatisticamente das concentrações mais altas, mas esses tratamentos apresentaram uma diferença altamente significativa dos resultados obtidos nas menores concentrações (5 e 10 mg mL⁻¹) em relação as demais e ao controle, isso pode ter ocorrido devido a dissociação de algumas substâncias químicas em maior quantidade de água adicionada ao extrato durante a sua diluição, onde houve uma redução no número de células em divisão, evidenciando assim um efeito citotóxico (p<0,01) (Figura 1D). Como também na observação de presença ou ausência de aberrações cromossômicas, pode-se verificar o aparecimento de pontes anafásicas e quebra de fuso acromático.

No bioensaio de extrato de folhas secas de mamona sobre sementes da alface nas diferentes concentrações apresentaram resultados que indicam um efeito alelopático crescente com o aumento das doses utilizadas (p<0,01). Conforme a Figura 1A, observou-se que para o IVG, houve diferença altamente significativa do controle em relação às concentrações de 10, 20 e 40 mg mL⁻¹ mas não diferiu da menor concentração de 5 mg mL⁻¹ (p<0,01). Sendo que as concentrações de 5 e 10 mg mL⁻¹ não diferiram entre si bem como não houve diferença entre 10 e 20 mg mg mL⁻¹ e entre 20 e 40 mg mg mL⁻¹. Resultados similares em relação ao IVG foram observados onde o mesmo apresentou uma relação negativa com a concentração do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides*, isto é, o aumento da solução do extrato promoveu uma diminuição dessa variável (Gatti et al., 2004).

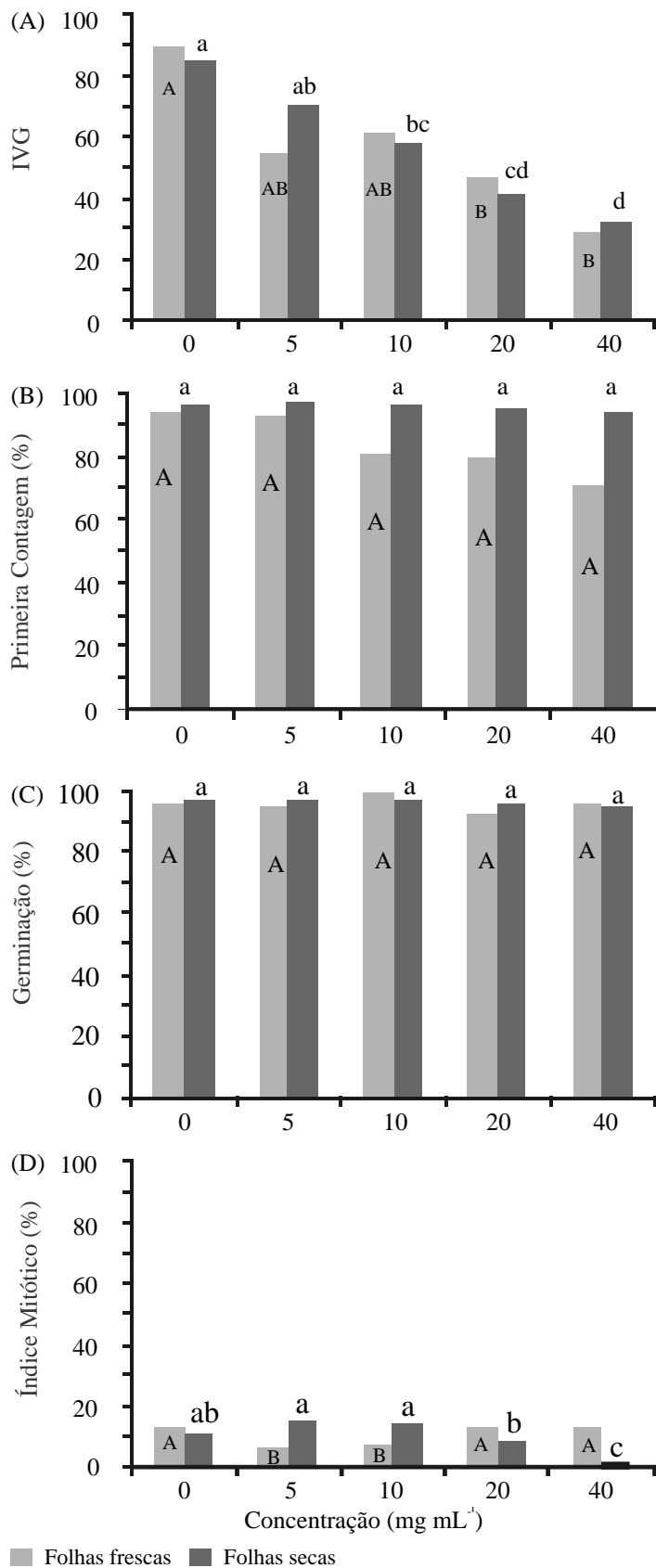


Figura 1. Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), primeira contagem (B), germinação (C) e índice mitótico (IM) (D) observados em sementes de alface sob efeito de diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas frescas e secas de mamona (*Ricinus communis*). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para folhas frescas e minúsculas para folhas secas não diferem pelo teste de Duncan a 1%.

Os testes de primeira contagem e germinação não apresentaram diferença significativa nas concentrações testadas, comprovando o que foi dito anteriormente que o efeito alelopático pode ser verificado por outro parâmetro de germinação ($p>0,01$) (Figura 1B e C). Embora seja comum alteração em algum parâmetro analisado, seja da germinação ou do crescimento, Ferreira et al. (2007) não observaram nenhuma alteração em sementes e plântulas de alface e picão-preto submetidas a extratos de *Pinnus elliotti* e *Eucalyptus citriodora*, em testes alelopáticos.

Já nas diferentes concentrações de extrato de folhas secas de mamona houve efeito citotóxico sobre sementes de alface. Na concentração mais alta houve oxidação do meristema radicular das sementes impedindo o crescimento das radículas ($p<0,01$).

Na análise do IM (Figura 1D), o controle não diferiu das concentrações mais baixas (5 e 10 mg mL⁻¹), assim como também não diferiu da concentração de 20 mg mL⁻¹. Mas foi altamente significativo em relação à concentração mais alta. As concentrações mais baixas (5 e 10 mg mL⁻¹) diferiram da terceira (20 mg mL⁻¹), porém, essas diferiram da concentração mais alta. Pode-se observar que as concentrações de 5 e 10 mg mL⁻¹ causaram um incremento na divisão celular, mas, não diferiram do controle ($p>0,01$).

O efeito citotóxico de folhas secas de mamona foi observado sobre as células do meristema de alface com o aumento da concentração. Em estudos de análise de bulbos de cebola (*Allium cepa*), verificaram que a concentração mais elevada promoveu uma regressão no IM, mas não o surgimento de alterações cromossômicas (Camparato et al., 2002), esses dados corroboram com os observados nesse trabalho.

Foi observado que ao fim do bioensaio, as raízes das sementes de alface apresentaram necrose, em algumas delas houve protrusão radicular, porém, a coifa mostrava-se totalmente oxidada, escurecida e, com o passar do tempo, as mesmas não cresceram mais, ocorrendo o amolecimento e a degradação de seus tecidos (Periotto et al., 2004). Com isso, indicando um efeito alelopático além do citotóxico descrito anteriormente (Rice, 1984). Outros efeitos causados por substâncias alelopáticas é o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Compostos químicos que muitas vezes apresentarem efeito alelopático também podem ter efeitos genotóxicos e mutagênicos (Ferreira & Áquila, 2000).

No experimento realizado com extrato de folhas frescas sobre sementes de cebola, conforme Figura 2A, B e C, pode-se observar que a qualidade fisiológica da semente não foi afetada pelas diferentes concentrações do extrato utilizado quando analisados os resultados dos testes do IVG, primeira contagem e germinação ou germinabilidade, pois esses não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação às diversas concentrações e o controle ($p>0,01$). Comprovando que para verificar efeitos alelopáticos, os testes de germinação, em geral, são menos sensíveis do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, massa, comprimento da radícula ou parte aérea (Ferreira & Áquila, 2000).

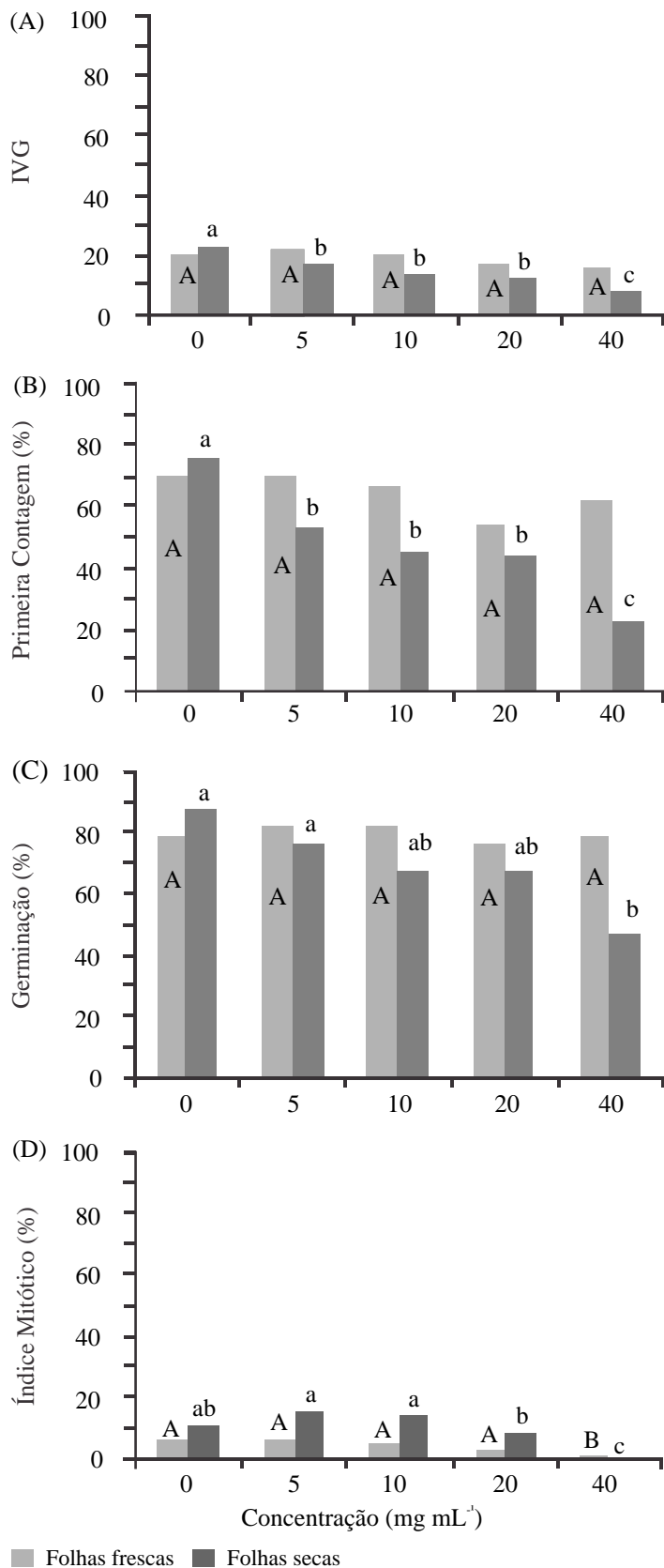


Figura 3. Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), primeira contagem (B), germinação (C) e índice mitótico (IM) (D) observados em sementes de cebola sob efeito de diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas frescas e secas de mamona (*Ricinus communis*). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para folhas frescas e minúsculas para folhas secas não diferem pelo teste de a Duncan 1%.

No entanto, as diferentes concentrações do extrato indicaram um efeito sobre a divisão celular de sementes de cebola na maior concentração ($p < 0,01$) (Figura 2D). Esses resultados corroboram com os observados Pires et al. (2000), onde o aumento da concentração do extrato leva a uma drástica redução do IM, ocasionando paralisação do crescimento radicular em sementes de milho tratadas com extrato de leucena (*Leucaena leucocephala*).

Os extratos de folhas secas de mamona sobre sementes de cebola nas diferentes concentrações apresentaram que indicam um efeito alelopático crescente com o aumento das doses utilizadas ($p < 0,01$). Conforme Figura 2A, observou-se que para o IVG, houve diferença altamente significativa do controle em relação a todas as concentrações analisadas, sendo que as concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹ não diferiram entre si.

Os testes de primeira contagem e germinação apresentaram diferenças significativas nas concentrações testadas, em relação ao controle ($p < 0,01$) (Figura 2B e C). Sendo que na primeira contagem o percentual de germinação nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹ não apresentaram diferença estatística entre si mas em relação ao controle e a concentração de 40 mg mL⁻¹. Para o teste de germinação, o controle e as concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹ não diferiram entre si assim como as concentrações de 10, 20 e 40 mg mL⁻¹.

Na análise do IM pode-se observar um efeito citotóxico onde o controle diferiu das concentrações de modo crescente, apresentando uma diferença altamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 2D).

Na observação de presença ou ausência de aberrações cromossômicas, os resultados tanto para extrato de folhas frescas quanto para extratos de folhas secas sobre sementes de cebola apresentaram algum tipo de aberração, pontes anafásicas quebra de fuso acromático e/ou micronúcleos, em todas as concentrações testadas. É interessante notar que as três alterações observadas neste trabalho são decorrentes de quebras de DNA, ou seja, podem ser conseqüências da ocorrência de deficiências e inversões de segmentos provocados pelas quebras. Além disso, as quebras expõem o DNA à ação de exonucleases e endonucleases, aumentando ainda mais a perda de material genético (Cheach & Osborn, 1978).

Podemos observar que houve um efeito citotóxico inversamente proporcional com o aumento das doses testadas verificando-se uma redução no índice de divisão celular. Podemos assim, inferir que o efeito citotóxico observado foi maior comparado ao efeito genotóxico, pois estatisticamente não houve diferença no número de alterações cromossômicas. Segundo Franke (2003), tais modificações podem com isso, prejudicar processos vitais das células, acarretando morte celular ou alterações cromossômicas, sendo chamados genotóxicos.

Conclusões

1. A ação dos extratos de folhas frescas e secas de mamona provocou efeito alelopático constatado na variável IVG e citotóxico na variável índice mitótico sobre sementes de alface nas diferentes concentrações testadas.

2. No experimento com extrato de folhas frescas sobre sementes de cebola pode-se observar que a qualidade fisiológica da semente não foi afetada pelas concentrações do extrato através dos testes do IVG, primeira contagem e germinação ou germinabilidade. Porém, apresentou um efeito citotóxico com o aumento das doses utilizadas.

3. No bioensaio com extrato de folhas secas sobre sementes de cebola observamos efeito alelopático em todos os testes utilizados assim como efeito citotóxico crescente com o aumento das concentrações.

4. No presente estudo, utilizando extrato de mamona, podemos verificar que os testes de primeira contagem e germinação ou germinabilidade são menos sensíveis para a análise do efeito alelopático.

Referências

BORELLA, J; PASTORINI, L.H. Interferência alelopática de extratos aquosos de raízes de erva-moura (*Solanum americanum*) sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.31-36, 2009. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n2_jun/tca06_extratos.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Divisão de Laboratório Vegetal. Brasília. 1992. 365p.

CAMPARATO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MONTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, n.25, v.1, p.85-89, 2002.

CHEACH, K.S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing syc seed. **Nature**, London, v.272, n.5654, p.593-599, 1978.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: ciência e desenvolvimento**, São Paulo, v.3, n.12, p.24-26, 2000. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio12/biomonitor.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

FARIA, V.P.; SOUZA, L.M.; SILVA, I.C.; SOARES, V.E.; BELO, M.A.A.; SILVA, J.; TORRENTE, A.C.G.; MAZZONETTO, F.; CHAGAS, A.C.S. Estudo comparativo do potencial toxigênico dos extratos aquosos de *Ricinus communis* (mamona) e *Passiflora quadrangularis*

(maracujá), sobre o *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista Saúde**, Guarulhos, v.4, n.1, p.128, 2010. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/707/794>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.12, (ed. Especial), p.175-204, 2000. Disponível em: <<http://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Gui-y-Alvez-1999.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

FERREIRA, M.C.; SOUZA, J.R.P. de; FARIA, T. de J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1054-1060, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000400017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2011.

FRANKE, I.R.; BOEIRA, J.M.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genotoxicidade dos agentes sintéticos e naturais**. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org.). *Genética Toxicológica*. 1 ed. Porto Alegre: Alcance, 2003, v.1, p. 309-317.

GABOR, W.E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. **Weed Science**, Ithaca, v.29, p.155 - 159, 1981.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G. de A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Aristolochia esparanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.18, n.3, p.459-472, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062004000300006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 nov. 2007.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos - um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC: Ribeirão Preto-SP, 2002. 131p.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Potencial Alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (*Asteraceae*). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.20, n.1, p.61-69, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062006000100007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 20 dez. 2007.

OHARA, G.H., KOJIMA, K.E., ROSSI, J.C.; TELLES, M.; SOARES, T.V.C.; SALOMAO, C.; SANDA, M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.3, p.62-68, 1995.

PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, n.3, p.425-430, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062004000300003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 jan. 2009.

PIRES, N.M; PRATES, H.T.; SOUZA, R.I.R.P.; FARIA, T.C.L.; PEREIRA, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do Extrato Aquoso de Leucena sobre o Desenvolvimento, Índice Mitótico e a Atividade da Peroxidase em Plantas de Milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.13, n.1, p.55-65, 2000.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Academic Press Inc.: London, 1984. 422p.

SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabolismos secundários**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. p.209-216.

SOARES, G.L.G.; SCALON, V.R.; PEREIRA, T.O.; VIEIRA, D.A. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. **Floresta e Ambiente**, v.9, n.1, p. 119-126, 2002. Disponível em: <http://www.floram.org/volumes/vol09-2002/Vol9%20119A126_resumo.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

SOUZA, S.A.M., STEIN, V.C., CATTELAN, L.V., BOBROWSKI, V.L., ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação de efeitos citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revistas de Biologia e Ciências da Terra**, Belo Horizonte, v.5, n.1, 2005. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/500/50050101.pdf>> Acesso em: 15 ago. 2011.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas, 1984.