

JANAINA RENATA DA SILVA

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE URUCUZEIRO
(*Bixa orellana* L.) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ALFACE (*Lactuca
sativa* L.)

Serra Talhada-PE

2020

**S
I
L
V
A**

**J
R**

**P
O
T
E
N
C
I
A
L**

**F
I
T
O
T
Ó
X
I
C
O**

**D
O**

**E
X**

**·
·
2
0
2
0**

JANAINA RENATA DA SILVA

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE URUCUZEIRO
(*Bixa orellana* L.) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ALFACE (*Lactuca
sativa* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos André de Souza

Serra Talhada-PE

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

586p

Silva, Janaina Renata da

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE URUCUZEIRO (*Bixa orellana* L.)
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) / Janaina Renata da Silva. - 2020.
70 f. : il.

Orientadora: Rogerio de Aquino Saraiva.

Coorientadora: Carlos Andre de Souza.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Serra Talhada, 2020.

1. Aleloquímicos. 2. *Bixa orellana* L.. 3. Fitotoxicidade. 4. Germinação. I. Saraiva, Rogerio de Aquino, orient. II. Souza, Carlos Andre de, coorient. III. Título

CDD 581.15

JANAINA RENATA DA SILVA

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE URUCUZEIRO
(*Bixa orellana* L.) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ALFACE (*Lactuca
sativa* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em 18/02/2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva – UAST/UFRPE
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Carlos André de Souza – UAST/UFRPE
Co-orientador, Examinador Externo

Prof. Dr. Sérgio Luís Ferreira Da Silva
Examinador Interno – UAST/UFRPE

Aos meus pais Maria Ivete e José Arão por estarem sempre ao meu lado me apoiando nesta jornada, incondicionalmente em todas as minhas decisões;

Ao amor da minha vida meu filho, Álex Cauã, por ser minha inspiração e a força para lutar, um companheiro fiel, estando sempre ao meu lado;

As minhas irmãs Carla Rejane, Maria Janete e Kaliane por todo amor e carinho e incentivo, e por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava;

Aos meus sobrinhos Ana Karyne, Lucas Gabriel, Maria Eduarda e Luis Gustavo por todo amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Deus maravilhoso que me permitiu chegar até aqui. À minha família que estive sempre ao meu lado incondicionalmente em todas as minhas decisões, com todo o amor. À minha mãe Ivete que sempre esteve ao meu lado lutando, me ajudando a cuidar do meu filho quando eu não podia. Mainha a te serei eternamente grata por acredita na minha capacidade e por sonhar meu sonho junto comigo. Juntas estamos realizando mais um sonho! Eu te prometi que estudaria em uma universidade federal e que lhe daria uma vida melhor, e cá estou eu! Chegando onde eu mesma duvidei que chegaria! Muito obrigada por me ensinar a lutar com unhas e dentes pelos meus objetivos! Tudo que sou hoje devo a senhora. Terá sempre minha admiração e meu amor. Eu te amo, minha rainha! Ao meu Pai José Arão por todo apoio e ajuda durante toda a minha vida acadêmica e por todo amor direcionado a mim. Te amo Painho!

Agradeço à Deus todos os dias por me presentear com uma jóia tão rara e preciosa como você, meu filho Álex Cauã. Tudo que faço, faço pensando sempre em você. É por você e para você meu amor! Perdoa-me por ter que passar um tempo longe de você, por muitas vezes não ter te colocado para dormir. Ficar longe de você foi a pior experiência da minha vida! Todos esses anos venho tentando ser uma boa mãe, falha as vezes, mas sempre tentando acertar. Você é a razão pelo qual me levanto todos os dias para lutar em busca de lhe dá uma vida melhor que a minha. Eu amo cada detalhe teu. Te amo mainha!

Às minhas irmãs Carla, Janete e Kaliane. Obrigada por todo amor direcionado a mim. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. Sou grata à Deus por ter cada uma de vocês em minha vida. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu não acredito e por me dá força sempre. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Lucas, Maria Eduarda e Luís Gustavo por alegrar meus dias e por todo amor direcionado a mim. Em especial a minha Ana. Tititia você me enisa tanto! Obrigada por acreditar em mim, por está sempre ao meu lado, por toda cumplicidade, por toda admiração, por me amar, por ter me ensinado a amar algo como se fosse meu a 15 anos atrás. Você é luz na minha vida! A vocês todo meu amor!

À minha amiga, comadre e irmã Maysa Keylla, meu muito obrigada. Obrigada por está sempre ao meu lado me dando força, carinho, amor e atenção. Por me ouvir mesmo quando as coisas não vão bem na tua vida. Não sei o que seria da minha vida sem a tua irmandade. Amo você!

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE-UAST) pelas oportunidades e todo conhecimento adquirido. Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela formação e todo conhecimento adquirido. À todos os professores do programa, em especial ao meu orientador Rogério de Aquino Saraiva por todos os ensinamentos que levarei para vida pessoal e profissional. Ao meu co-orientador Carlos André por toda disponibilidade e ensinamentos adquiridos. A todos vocês, obrigada!

Família PGPV, obrigada por fazerem meus dias mais leves nesta caminhada. Por cada risada, cada conversa, por cada momento juntos. Obrigada Ana Maria, Danielle, Marcela, Cinara, Bautazar, Mirna, João Paulo, Fernanda, Philipi, Regina, Nielson, Kleber, Bautazar, Domingos, Yara, Gebson, Pedro do mestrado, Gabriel. Levarei vocês em meu coração sempre!

Ao Grupo de Estudo em Bioquímica e Ecotoxicologia (GEBETox) do qual faço parte. Obrigada por todo aprendizado e pelas amizades que construí. Obrigada Robson, Maria da Saúde, Lisandra, Jaqueline, Luana, Maraíza.

Ao meu amigo e irmão que ganhei de presente desde o primeiro dia que nos encontramos no mestrado Yuri pelo qual tenho muito amor e uma admiração imensa. Obrigada amigo por está sempre ao meu lado. Sem duvidas você foi uma das melhores coisas que me aconteceu nesses dois anos de luta.

À minha Flor de Mandacará Patricia, por toda atenção e carinho direcionados a mim. Obrigada por me ensinar a não aceitar tudo por medo de dá minha opinião. Por me ensinar a ter voz e vez. Por me ensina que mereço sempre o melhor e que não preciso fazer nada somente para agradar o outro. Obrigada por me permitir conviver contigo e fazer parte da tua vida. Por me ouvir e me aconselhar sempre que preciso. Por dividir comigo tua vida, me fazer rir, por me aceitar do jeitinho doido que eu sou. Por acreditar em mim. Sentirei muita saudade de você minha irmã de outra mãe. Amo você!

A minha Plenitude linda Ruth, por todo amor, carinho, atenção comigo e com meu filho. Por toda irmandade. Por ser calma quando sou uma tempestade. Por me ensinar a ver a vida e os meus problemas sempre com outros olhos. Obrigada Ruthzinha por ser esse ser tão iluminado e lindo. Sou grata a Deus por te ter em minha vida. Aah UAST, você me deu tantos presentes... as pessoas e coraçõemas lindo. Obrigada por tanto meu amor!

Agradeço também a Valécia, por todos esses sete anos de irmandade. Por está sempre ao meu lado e dividir comigo sua vida! Obrigada meu amor por ser essa pessoa maravilhosa que você é. Por amar meu filho como se fosse seu. Sem duvidas fui muito feliz ao te encontrar

e te trazer para minha vida. Já vivemos tantas coisas juntas que poderíamos escrever um livro (kkkkkk). Amo muito você comadre!

Até aqui me ajudou o Senhor! Serei eternamente grata por tudo sempre!

Tudo posso naquele que me fortalece.

(Filipenses 4:13)

RESUMO GERAL

Estresses bióticos e/ou abióticos desencadeiam, em vegetais, a produção de metabólitos secundários, que são de extrema importância para aclimação e defesa da planta. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito fitotóxico do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) sobre o desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.). Em placas de Petri foi criado um micro ambiente, no qual sementes de *Lactuca sativa* L. foram expostas a diferentes concentrações do EABO (25%, 50%, 75% e 100%) e aclimatadas em câmara de germinação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 ± 2 °C, e acompanhadas durante sete dias. No sétimo dia de experimento, avaliações biométricas, índices de velocidade de germinação, vigor, índice de tolerância, teor de clorofila a, b, totais, carotenoides e histoquímica foram realizadas. O número de sementes germinadas apresentou um retardo nas concentrações de extrato mais elevadas. O comprimento da radícula das plântulas reduziu quando aplicada a concentração de 100% do EABO. A medida em que se aumentou as concentrações do extrato, o conteúdo de clorofilas a, totais e carotenoides sofreram alterações, bem como, no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Os resultados revelaram que o extrato aquoso de *Bixa orellana* L. possui efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

Palavras-chave: Fitotoxicidade, Germinação, Metabólitos secundários, Urucum.

GENERAL ABSTRACT

Biotic and/or abiotic stresses trigger, in vegetables, the production of secondary metabolites, which are extremely important for acclimatization and defense of the plant. In this context, the objective was to evaluate the phytotoxic effect of the aqueous extract of the leaves of *Bixa orellana* L. (EABO) on the initial development of lettuce (*Lactuca sativa* L.). In petri dishes a micro environment was created, in which seeds of *Lactuca sativa* L. Were exposed to different concentrations of EABO (25%, 50%, 75% and 100%) and acclimated in a germination chamber of the BOD type (*Biochemical Oxygen Demand*) at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, and followed for seven days. On the seventh day of the experiment, biometric evaluations, germination speed indexes, vigor, tolerance index, chlorophyll content a, b, totals, carotenoids and histochemistry were performed. The number of germinated seeds showed a delay in the highest extract concentrations. The radicle length of the seedlings reduced when 100% EABO concentration was applied. As the concentrations of the extract increased, the content of chlorophylls a, totals and carotenoids underwent changes, as well as, in the metabolism of carbohydrates and lipids. The results revealed that the aqueous extract of *Bixa orellana* L. Has a phytotoxic effect on the initial development of *Lactuca sativa* L.

Keywords: Annatto, Germination, Phytotoxicity, Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO.....	13
CAPÍTULO 1.....	15
Figura 1 Estruturas morfológicas da espécie <i>Bixa orellana</i> L. (Urucum), evidenciando a planta por inteiro (a); (b) folhas e flores; (c) fruto em formato de cápsula maduro; (d) maturação plena dos frutos e sementes.....	17
Figura 2 Estrutura química de alguns dos carotenoides encontrados nas sementes de <i>Bixa orellana</i> L. (Urucum). (a) bixina; (b) norbixina; (c) luteína; (d) zeaxantina e (e) trans-bixina.....	20
Figura 3 Exemplos de alcaloides, mostrando a ciclização e presença de nitrogênio (N) na molécula de (a) morfina e (b) nicotina.....	23
Figura 4 Estrutura química de compostos aromáticos monocíclicos naturais, vanilina e benzaldeído.....	24
Figura 5 Estrutura básica dos flavonóides, evidenciando os três anéis constituintes (A, B e C).....	24
CAPÍTULO 2.....	33
Figura 1 Comportamento da germinação de sementes de <i>L. sativa</i> expostas a concentrações do extrato aquoso de folhas de <i>B. orellana</i> L. (EABO) durante sete dias, em relação ao grupo controle (0%)	61
Figura 2 Efeito do extrato aquoso de folhas de <i>Bixa orellana</i> L. sobre o comprimento radícula (A) e hipocótilo (B) de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. Letras diferentes representam valores médios que diferem significativamente entre si para $p < 0,05$	61

- Figura 3 Plântulas de *Lactuca sativa* L. obtidas após sete dias de germinação na presença de água destilada ou diferentes concentrações de EABO, indicando sua influência no comprimento da radícula para os tratamentos (B) 25%; (C) 50%, (D) 75% e (E) 100% em relação ao tratamento controle (A) 0%..... 62
- Figura 4 Percentual de plântulas de *Lactuca sativa* com necrose em diferentes estruturas, tratadas com EABO. (A) Gráfico com percentual de plântulas com radículas analisadas com necrose; (B) Percentual de plântulas com folhas cotiledonares analisadas com necrose. (C) Observação em lupa estereoscópica de folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. (aumento de 40x). (1) Folhas cotiledonares de plântulas representativas do grupo controle (tratamento água destilada, 0% EABO); (2) Folhas primárias de plântulas representativas do grupo EABO (0,1 g MF.mL⁻¹) nas concentrações 75% (esquerda) e 100% (direita)..... 63
- Figura 5 Observação em microscópio óptico de cortes anatômicos transversais da radícula de *L. Sativa* L. sobre influência do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) (aumento 10x). Imagens (A), (C) e (E) representam o controle; imagens (B), (D) e (F) representam o tratamento de maior concentração (100%). (A) e (B) representam a forma estrutural das células coradas com Azul de Toluidina; (C) e (D) coradas com Lugol indicam a presença de amido (ST); (E) e [100%] (F) coradas com Sudan III indicam a presença de lipídeos (LP)..... 64
- Figura 6 Observação em microscópio óptico de cortes anatômicos transversais das folhas cotiledonares de *L. Sativa* L. sobre influência do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) (aumento 10x). Imagens (A), (C) e (E) representam o controle; imagens B, D e F representam o tratamento de maior concentração (100%). (A) e (B) representam a forma estrutural das células coradas com Azul de Toluidina; (C) e (D) coradas com Lugol indicam a presença de amido (ST); (E) e (F) coradas com Sudan III indicam a presença de lipídeos (LP)..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classes de metabólitos secundários detectados na análise fitoquímica qualitativa do extrato aquoso das folhas de <i>Bixa orellana</i> (EABO).....	58
Tabela 2	Características físico-químicas do extrato aquoso das folhas de <i>Bixa Orellana</i> L. (EABO).....	58
Tabela 3	Parâmetros avaliados na germinação e desenvolvimento das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. sob influência de diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas de <i>Bixa Orellana</i> L. (EABO) após sete dias.....	59
Tabela 4	Teor de clorofila a,b e totais e carotenoides em plântulas de <i>Lactuca sativa</i> L. submetidas a diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de <i>Bixa orellana</i> L. (EABO).....	60

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1. URUCUZEIRO (<i>Bixa orellana</i> L.).....	16
1.1. Aspectos botânicos e importância econômica	16
1.2. Fitoquímica	19
1.3. Atividades farmacológicas descritas	20
2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS	21
2.1. Alcaloides	22
2.2. Compostos Fenólicos	23
3. ALELOPATIA E ALELOQUÍMICOS.....	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	33
POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>Bixa orellana</i> L. (URUCUM) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>Lactuca sativa</i> L. (ALFACE)	34
RESUMO	34
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Material Vegetal.....	37
2.2 Obtenção do extrato aquoso das folhas de <i>Bixa orellana</i> L. (EABO)	37
2.3 Prospecção fitoquímica qualitativa do EABO	38
2.4 Diluição do EABO	<u>Erro! Indicador não definido.</u>
2.5 Ensaio de germinação de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença do EABO	40
2.7 Índices de desenvolvimento e fitotoxicidade.....	41
2.7.1 Número de sementes germinadas (NSG/Dia) e Índice de velocidade de germinação (IVG).....	41
2.7.2 Índice de Vigor.....	42
2.7.3 Índice de tolerância (IT) ao EABO	42
2.8 Presença de necrose.....	43
2.9 Parâmetros físico-químicos	43
2.10 Teor de Clorofilas e Carotenoides.....	43

2.11 Análise Histoquímica	44
2.12 Análises Estatísticas	45
3 RESULTADOS	45
3.1 Perfil Fitoquímico do EABO	45
3.2 Parâmetros Físico-químicos: pH, condutividade elétrica e Pressão osmótica do EABO ..	45
3.3 Índices de Desenvolvimento e Fitotoxicidade	46
3.4 Teor de Clorofilas e Carotenoides	47
3.5 Características anatômicas e histoquímicas de plântulas de alface sobre influência do EABO	47
4 DISCUSSÃO	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6 AGRADECIMENTOS	54
7 CONFLITOS DE INTERESSE	54
8 REFERÊNCIAS	55
TABELAS	59
FIGURAS	62

APRESENTAÇÃO

As plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa ao longo do tempo. Entre eles, a produção de metabólitos secundários, os quais estão relacionados principalmente com os mecanismos de defesa da planta contra patógenos e/ou herbívoros. Quando submetidas a estresses de origem biótica e/ou abiótica, as plantas produzem estes metabólitos em resposta ao estresse sofrido.

Os metabólitos secundários são agrupados principalmente nas classes dos terpenóides, fenóis e alcalóides. A produção destes metabólitos pode ocasionar efeitos diretos ou indiretos a espécies vegetais adjacentes, inibindo ou retardando o desenvolvimento natural de outras espécies. É fato que as espécies vegetais interagem entre si e também com outros organismos vizinhos. Essas interações ecológicas ocorrem naturalmente na natureza, por meio de vários mecanismos químicos. A liberação dos aleloquímicos no meio ambiente ocorre através da decomposição, exsudação, volatilização e lixiviação de materiais vegetais, interferindo, desse modo, no crescimento e desenvolvimento de outras espécies vegetais, causando alterações morfofisiológicas.

Práticas de manejo de espécies com características alelopáticas são necessárias para que estas espécies não interfiram no desenvolvimento de outros indivíduos. No entanto, ainda existe uma enorme quantidade de espécie vegetais que carecem serem estudadas/investigadas para identificação das biomoléculas sintetizadas no seu metabolismo no que diz respeito a sua fitotóxicidade e sua interação com outras espécies vegetais, como é o caso da espécie *Bixa orellana* L.

Bixa orellana L popularmente conhecida como Urucum, tem origem na América tropical, sendo bem difundida nos trópicos em todo o mundo. No Brasil, ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Embora seja nativa da América continental e amplamente introduzida em todos os demais continentes com fins econômicos, *B. orellana* tem status de planta invasiva em várias ilhas do Pacífico. Apresenta ainda, uma variedade de atividades biológicas ampliando sua aplicabilidade na medicina tradicional.

Considerada como uma das espécies vegetais mais importantes economicamente, o Urucum tem sido explorado nos países em desenvolvimento principalmente na forma de sementes, devido a sua diversidade de utilidade que vai desde o uso na culinária na forma de corante, colorau, ao uso nas indústrias têxteis e farmacêuticas. Em suas sementes, folhas e

casacos de sementes são encontrados diversos constituintes químicos. *B. Orellana* L. apresenta uma grande diversidade de atividades biológicas, importância econômica, medicinal significativa, dentre outras variedades de uso. No entanto, o conhecimento sobre seu potencial fitotóxico e sua interferência no desenvolvimento de outras espécies vegetais é ainda escasso na literatura, não havendo nenhum registro até o momento, abri espaço para novas investigações.

Desse modo, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O capítulo I, trata-se da revisão de literatura, no qual procura-se abordar sobre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas e o potencial fitotóxicos de espécies vegetais, como por exemplo, a espécie *Bixa orellana* L., sobre o crescimento inicial e desenvolvimento de outra planta. O capítulo II, trata-se de um artigo completo, referente a avaliações sobre o potencial fitotóxico do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. sobre o desenvolvimento inicial de alface.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. URUCUZEIRO (*Bixa orellana* L.)

1.1. Aspectos botânicos e importância econômica

Bixa orellana L. (família Bixaceae), popularmente conhecida como urucueiro ou urucuzeiro, é uma planta arbustiva com porte de até 6 m de altura, considerada rústica, perenifólia, heliófita e pioneira (EMBRAPA, 2009). O nome do gênero “*Bixa*” tem origem indígena (dos povos Taínos) e o epíteto específico “*orellana*” foi dado em homenagem ao expedicionário e explorador da Amazônia Francisco d’Orellana (MERCADANTE, 2001; BOLOGNESI; GARCIA, 2018). Tem origem na América tropical (MERCADANTE, 2001; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018), sendo bem difundida nos trópicos em todo o mundo. No Brasil, ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). Recentemente, tem-se argumentado que *B. orellana* é uma espécie cultivada domesticada a partir de *B. urucurana* no norte da América do Sul (MOREIRA et al., 2015).

Apesar de ser nativa da América continental e amplamente introduzida em todos os demais continentes com fins econômicos, os trabalhos de Henty e colaboradores (1981), Smith e colaboradores (1981), Wagner e colaboradores (1999) e em relatórios atualizados do Instituto das Florestas das Ilhas do Pacífico (Institute of Pacific Islands Forestry) (PIER, 2018) atribuem à *B. orellana* status de planta invasora em várias ilhas do Pacífico (Havaí, Fiji, Papua Nova Guiné, Ilhas Christmas, Ilhas Cook, Polinésia francesa, Nova Caledônia e Ilhas Galápagos).

O urucuzeiro se desenvolve preferencialmente em solos férteis e úmidos de beira de rios (LORENZI, 2008). Possui madeira leve, mole e de cor amarelada (ALONSO, 2004). Sua copa é baixa, densa e bem desenvolvida; folhas simples, glabras, membranáceas de 8 a 11 centímetros de comprimento e flores levemente rosadas, reunidas em panículas terminais (LORENZI, 2008; MAJOLO et al., 2013); normalmente suas flores surgem durante a primavera e no início do verão (LORENZI, 2008). A frutificação ocorre ao longo do ano, em sua maioria no inverno (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). A Figura 1 a baixo mostra diferentes partes da planta Urucum:



Figura 1: Estruturas morfológicas da espécie *Bixa orellana* L. (Urucum), evidenciando a planta por inteiro (a); (b) folhas e flores; (c) fruto em formato de cápsula maduro; (d) maturação plena dos frutos e sementes. (Fonte: do Autor)

O fruto do urucuzeiro é fonte de um dos corantes naturais mais consumidos do mundo – o urucu ou urucum, e é a matéria-prima para a produção do colorau, corante amplamente usado na culinária (CHENGAIHAH, et al., 2010). Do ponto de vista anatômico, seu fruto (denominado de cápsulas ou cacholas) possui formato de cápsulas ovais e achatadas, elipsóides hemisféricas ou cônicas (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018), deiscente, revestido por espinhos moles e apresenta de 10 – 50 sementes (MERCADANTE, 2001; ALONSO, 2004; KANG et al., 2010; BOLOGNESI; GARCIA, 2018). Suas sementes são revestidas por uma singela camada de uma substância amarelo-avermelhada, onde é extraído o urucum (ALONSO, 2004), A dispersão das sementes ocorre através dos animais e pelo homem (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

O urucum tem sido explorado nos países em desenvolvimento principalmente na forma de sementes (BARROZO; SANTOS; CUNHA, 2013), sendo uma das espécies vegetais

mais importantes economicamente, devido ao seu alto potencial de uso em uma variedade de produtos (ALVES et al., 2006). O urucum é considerado um dos pigmentos naturais mais utilizados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos (pode ser empregado em bebidas, laticínios, produtos cárneos e confeitaria), por apresentar coloração intensa e estabilidade sob diversas condições de processamento (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; SCOTTER, 2009; CHENGAIHAH, et al., 2010; BITENCOURT et al., 2018). Representa cerca de 90% dos corantes naturais totais utilizados na indústria alimentícia brasileira e aproximadamente 70% no mercado internacional (GHIRALDINI, 1989).

Este pigmento é fonte de moléculas lipossolúveis e hidrossolúveis que permite seu emprego em uma variedade de produtos alimentícios. Destaca-se também sua baixa toxicidade e baixo custo de produção, sendo uma alternativa viável para substituir corantes sintéticos por corantes naturais (AGNER et al., 2004). Além disso, exibe uma melhor biodegradação e possui normalmente maior compatibilidade com o ambiente quando comparado a corantes sintéticos (SINHA et al., 2013).

A bixina e norbixina, principais carotenoides encontrados no urucum, além de serem aplicados nas indústrias como corantes, são utilizados também como antioxidantes naturais, uma vez que possibilita a substituição ou redução de aditivos químicos (sintéticos) em produtos cárneos (GARCIA et al., 2012). Estes compostos podem ser aplicados para retardar o processo de ranço oxidativo em carnes devido a presença de dienos conjugados em sua cadeia carbônica (BOLOGNESI; GARCIA, 2018).

O Brasil se tornou o maior produtor, consumidor e exportador mundial de sementes e corantes de urucum (CARVALHO, 2018a). É responsável por cerca de 57% da produção mundial de urucum. Em 2015, produziu cerca de 10.000 t e 12.000 t. Em 2016, a produção de sementes chegou a 12.817 t, onde a região Sudeste teve maior produção (4.758 t), seguido pela região Norte (3.488 t), Nordeste (2.746 t), Sul (1.134 t) e o Centro-Oeste apresentou menor produção (691 t) (CARVALHO, 2018b).

A América Latina é responsável pela maior parte da produção das sementes, seguida da África e da Ásia (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2011). Destacam-se como produtores mundiais importantes: Peru, com 31% (6.000 t), Costa do Marfim e Gana (5.000 t), Quênia (2.000 t), Guatemala (1.500 t), República Dominicana (900 t), Bolívia (500 t), Equador (400 t), Índia (300 t) e México (200 t) (FABRI, 2015).

1.2. Fitoquímica

B. orellana L. apresenta diversos constituintes químicos encontrados principalmente em suas sementes, folhas e casacos de sementes. Entre eles, os carotenoides, apocarotenoides, terpenos, terpenoides, esteróis, compostos alifáticos, monoterpênicos e sesquiterpenos, triterpenoides e outros compostos. No entanto, os carotenoides e apocarotenoides são os principais compostos encontrados na planta (VILAR et al., 2014; ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016).

A maioria dos carotenoides e apocarotenoides descritos foram isolados das sementes e casacos de sementes de *B. orellana* L. (ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016) no qual a bixina [metil-hidrogênio-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, figura 2-A] é o principal composto carotenóide encontrado nas sementes, revestindo-as (PRESTON; RCKARD, 1980; LAURO, 1991), e o apocarotenóide norbixina. Outros carotenóides como a luteína, zeaxantina (TIRIMANNA, 19981), 6-geranilgeranil-6'-metil-(9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997) e trans-bixina, entre outros, (ANDERSONW et al., 1997) (figura 2). Terpenóides como farnesilacetona, octadecanoato de geranilgeranil (JONDIKO; PATTENDEN, 1989), β -tocotrienol e δ -tocotrienol (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998) e compostos voláteis como (Z,E)-acetato de farnesil, acetato de occidentalol, spathulenol e ishwarane (PINO; CORREA, 2011) também foram isolados das sementes de urucum.

Nas folhas de urucum já foi relatado que há presença de terpenos como α -carpofileno, α -copaeno, α -elemeno e cis-ocimeno (STOHS, 2014) e outros tantos compostos como, por exemplo, fitol, stigmasterol, sitosterol (RAGA et al., 2011), leucocianidina, ácido elágico, luteolina e apigenina (HARBORNE, 1975).

Além de carotenoides em suas sementes há ainda ácidos graxos, tais como, ácido linoleico, oleico, ácido palmítico (RAO et al., 2015) que contribuem ainda mais para a baixa solubilidade do extrato em água (BITENCOURT et al., 2018). Este carotenóide é formado por dois grupos carboxílicos e nove ligações duplas conjugadas (LOBATO et al., 2013). A bixina apresenta coloração avermelhada e um grupo éster metílico que atenua suas características lipofílicas, e a norbixina, de cor amarelada, exibe em sua estrutura química dois ácidos carboxílicos que lhe confere solubilidade em água (BOLOGNESI; GARCIA, 2018).

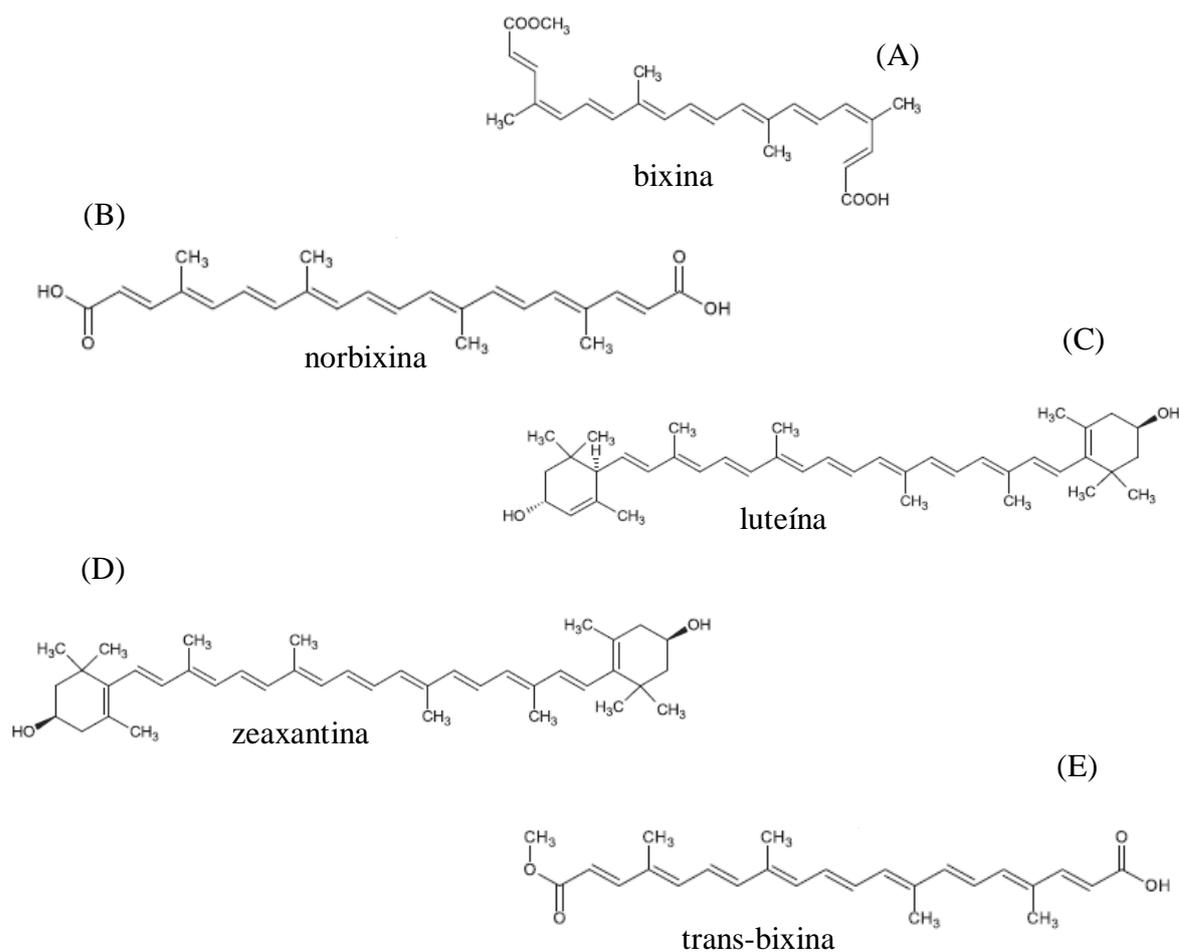


Figura 2: Estrutura química de alguns dos carotenoides encontrados nas sementes de *Bixa orellana* L. (Urucum). (a) bixina; (b) norbixina; (c) luteína; (d) zeaxantina e (e) trans-bixina. (ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016) (Adaptado).

1.3. Atividades farmacológicas descritas

Nos últimos anos, estudos relataram que o extrato de folhas, raiz, caule e sementes de *Bixa orellana* L. são comumente utilizados para fins medicinais. *B. orellana* L. apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, neurofarmacológica, anticarcinogênica, motilidade gastrointestinal, anticonvulsivante, antidiarreica e analgésicas, bem como, sequestradoras de radicais livres, entre outras (SHILPI et al., 2006; ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). Além disso, *B. orellana* tem sido utilizada para tratamento

e anticoncepção de problemas de saúde como doenças de pele, diarreia, queimaduras, asma, infecções urinárias, úlcera e febre (VILLAR et al., 1997).

Quando comparada com medicamentos padrões testados, a grande maioria dos extratos obtidos de *B. orellana* demonstram atividade biológica eficaz, tornando este vegetal um potencial candidato para o desenvolvimento e produção de fármacos com maior eficiência e segurança para o consumo (ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016).

Investigações realizadas demonstraram a ação do extrato de folhas de *B. orellana* no tratamento de picadas de cobra, tosse e como digestivo alimentar (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001), além de inibir o crescimento de bactérias como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella dysenteriae*. Por outro lado, não inibiu o crescimento de *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* (SHILPI et al., 2006). No entanto, os extratos metanólicos obtidos de folhas e sementes de *B. orellana* apresentaram efeito inibitório contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* demonstrando que o extrato obtido apresentou efeito citotóxico quando em elevadas concentrações. Evidenciando que este produto natural pode trazer novas alternativas para os tratamentos antibióticos utilizados em infecções orais (MEDINA-FLORES et al., 2016).

2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS

Diferente dos metabólitos primários que são macromoléculas resultantes de processos bioquímicos de suma importância para o crescimento e desenvolvimento vegetal, como a fotossíntese, respiração celular e transporte de elétrons que estão diretamente relacionados com a síntese de carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, aminoácidos (HERBERT, 1989; DIXON, 2001; THAKUR et al., 2019), os metabólitos secundários estão relacionados principalmente com a defesa da planta contra patógenos e/ou herbívoros. Além disso, são considerados uma fonte significativa de fármacos, bem como, desempenham um papel ativo na adaptação das plantas as condições impostas pelo meio ambiente (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Os alcalóides, antocianinas, flavonóides, quinonas, lignanas, esteróides e terpenóides, utilizados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromas, fragrâncias, cores, biopesticidas e aditivos alimentares, fazem parte da variedade de metabólitos secundários sintetizados em plantas superiores (THAKUR et al., 2019). No entanto, os três principais tipos de metabólitos secundários são aqueles contendo compostos fenólicos, terpenos e alcalóides

(KALLSCHEUER et al., 2019), os quais são produzidos no corpo da planta. Para os terpenos a unidade básica é o isoterpenóide 5-C (são toxinas capazes de deter herbívoros). A via do ácido chiquímico fornece os produtos que dão origem aos fenólicos (confere capacidade defensiva as plantas). Já aqueles compostos que contêm nitrogênio e/ou enxofre são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos (ROSENTHAL, 1991; VAN ETTEN et al., 1994; ZAYNAB et al., 2018). Os metabólitos secundários são sintetizados basicamente tendo a glicose proveniente do metabolismo primário como precursor, por meio do ácido chiquímico e do acetato por vias metabólicas distintas (DEWICK, 2009).

Todas as espécies vegetais são produtoras de metabólitos secundários. No entanto, os níveis endógenos de metabólitos secundários (em termos de quantidade e qualidade) podem variar de uma espécie para outra, ou ainda, entre indivíduos de mesma espécie (BARTRON, 2007), bem como, seu local de síntese nas diferentes partes da planta. Além disso, podem sofrer influência de estresses ambientais como seca, temperatura, íons metálicos, deficiência nutricional, radiação ultravioleta (UV), salinidade, sazonalidade e luz (GOUVEA et al., 2012). Portanto, fatores bióticos podem influenciar as concentrações destes, e induzir o mecanismo de defesa da planta (ASHRAF et al., 2018).

2.1. Alcaloides

Os alcaloides são compostos químicos heterocíclicos biologicamente ativos apresentando pelo menos um nitrogênio (N) em sua estrutura química (Figura 3), apresentando uma vasta e complexa gama de moléculas (ANISZEWSKI, 1994; ANISZEWSKI, 2007) com propriedades farmacológicas exercendo importantes funções ecológicas (ANISZEWSKI, 1994). Em espécies vegetais, os alcaloides são relatados por apresentar potencial herbicida devido a toxicidade que pode apresentar, agindo na defesa química da planta, bem como, fornecem importantes atividades farmacológicas, tais como, antioxidantes, antitumorais, analgésicos, antiinflamatórios e estimulantes (YANG; STÖCKIGT, 2010).

Segundo Dewick, (2002) e Tadeusz (2007), os alcalóides podem ser classificados/divididos em três categorias: (1) alcaloides verdadeiros: são aqueles derivados de aminoácidos e que compartilham um anel heterocíclico com nitrogênio; (2) protoalcalóides: o nitrogênio derivado do aminoácido não faz parte do anel heterocíclico; (3) pseudoalcalóides: o esqueleto básico de carbono não é derivado diretamente dos aminoácidos. A incorporação de nitrogênio ocorre em um estágio relativamente após sua via biossintética.

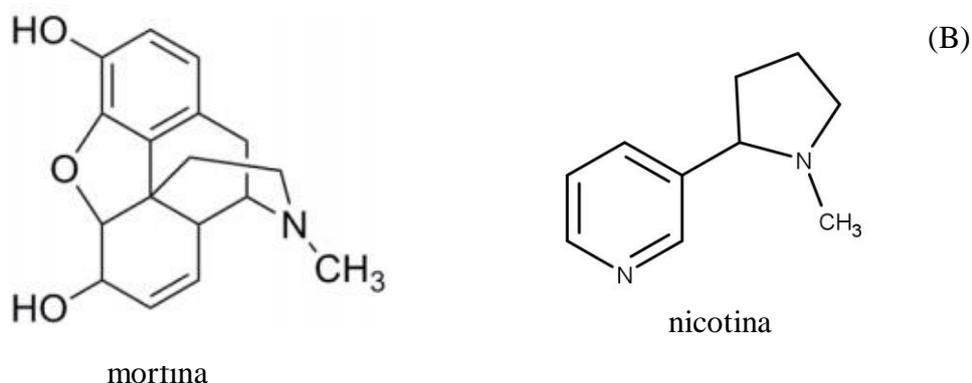


Figura 3: Exemplos de alcaloides, mostrando a ciclização e presença de nitrogênio (N) na molécula de (a) morfina e (b) nicotina.

Os alcalóides podem estar presentes em todas as partes da planta e/ou em tecidos específicos, como as raízes e sementes, por exemplo (TAKSHAK; AGRAWAL, 2019). Ecologicamente exercem funções que vão desde a proteção das plantas contra herbívoros e pragas, a atração de insetos para realizar polinização (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; TADEUSZ, 2007).

2.2. Compostos Fenólicos

Os fenóis provenientes de plantas abrangem uma grande família de compostos aromáticos variando de ácidos benzóicos monocíclicos hidroxilados a compostos policíclicos mais complexos, como estilbenos e flavonóides (HOLLMAN, 2001). Os compostos aromáticos monocíclicos naturais, que são utilizados como agentes aromatizantes, abrangem, por exemplo, vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído), benzaldeído e framboesa cetona [4-(4-hidroxifenil) -2-butanona] (GALLAGE; MOLLER, 2018) (figura 4).

Os compostos fenólicos formam uma classe de metabólitos secundários essencial de plantas aromáticas (MALCOVSKA et al., 2014), no qual o anel fenil apresenta um ou mais grupos hidroxila ligados (ACHAKZAI et al., 2009; ALI et al., 2013). Foram divididos em diferentes grupos como ligninas, lignanas, cumarinas, flavonoides, taninos, (PEREIRA et al., 2009; FANG et al., 2011), estibenos, estilpironas e arilpironas (FANG et al., 2011), os quais são compostos químicos essenciais para a planta. São provenientes de rotas alternativas como as vias do ácido chiquímico e acetate-mevalonato, por exemplo (PEREIRA et al., 2009).

A via do ácido malônico é menos comum em plantas superiores, já a via do ácido chiquímico é comum em plantas. Na via do ácido chiquímico, precursores derivados da glicólise e a fosfato de pentose são convertidos em uma diversidade de aminoácidos aromáticos nos quais a fenilalanina é o intermediário mais comum/frequente (VERMA; SHUKLA, 2015). Os compostos fenólicos são responsáveis por desempenhar diversas funções importantes nas plantas (CHAPARRO et al., 2013), tais como, crescimento, reprodução e tolerância das plantas a estresses abióticos e bióticos (ACHAKZAI et al., 2009; GIMÉNEZ et al., 2014).

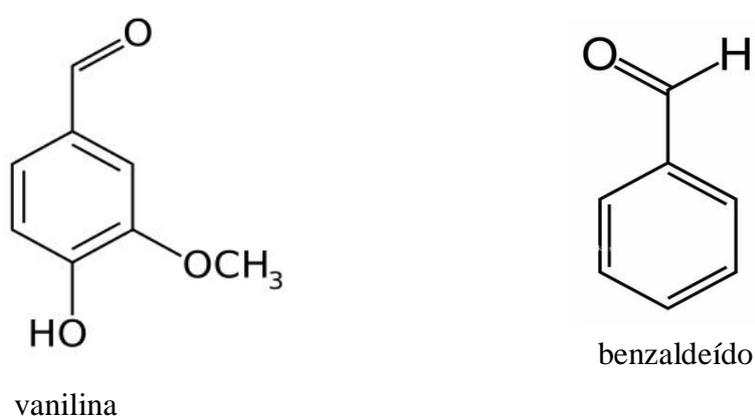


Figura 4: Estrutura química de compostos aromáticos monocíclicos naturais, vanilina e benzaldeído (Adaptado).

Os fenólicos juntamente (aliados) com os flavonóides compõem um grande grupo de fitoquímicos. Esses compostos estão presentes em cascas de frutas e folhas em altas concentrações e participam da defesa das plantas contra pigmentação, resistência aos raios UV e a doenças (PIERPOINT, 2000) (figura 5).

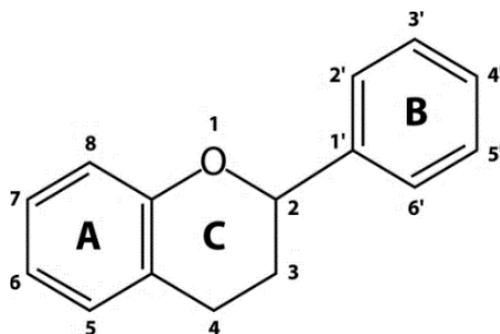


Figura 5: Estrutura básica dos flavonóides, evidenciando os três anéis constituintes (A, B e C).
Fonte: (Março; Poppi, 2008) (Adaptado).

3. ALELOPATIA E ALELOQUÍMICOS

O termo alelopatia foi proposto por Hans Molisch em 1937, no qual sugeriu que as plantas produzem biomoléculas (aleloquímicos), capazes de causar danos ou não nos tecidos vegetais, podendo interferir em uma planta vizinha (VIDAL; BAUMAN, 1997). A palavra alelopatia vem do grego “*allelon*” = mútuo e “*pathos*” = dano, que significa “dano mútuo” ou “sofrimento” (RIZVI; RIZVI, 1992).

A alelopatia pode ser definida como sendo uma interação positiva e/ou negativa de metabólitos secundários produzidos por uma planta (aleloquímicos) e liberados no ambiente (RIZVI; RIZVI, 1992; INDERJIT et al., 2011). Sua interferência no crescimento e desenvolvimento de outra planta pode ser indireta, transformando tais substâncias no solo por meio da atividade de microrganismos (INDERJIT et al., 2011).

Naturalmente as espécies vegetais realizam interações ecológicas entre si e com outros organismos vizinhos, através de vários mecanismos químicos. A liberação dos aleloquímicos no meio ambiente pode ocorrer por meio da decomposição de resíduos vegetais, exsudação radicular, volatilização e lixiviação (de folhas, raízes, frutos e sementes), interferindo, desse modo, no crescimento e desenvolvimento de outras espécies vegetais (INDERJIT; DUKE, 2003; WESTON; DUKE, 2003; ASGHARIPOUR; ARMIN, 2010).

Estes aleloquímicos podem causar efeitos inibitórios e/ou estimuladores agindo de maneira direta ou indireta sobre outros organismos (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006). As plantas são afetadas por estas substâncias químicas principalmente nas fases de emergência e estágio de plântulas (ALAM; ISLAM, 2002; HUSSAIN et al., 2007; MOHAMADI; RAJAIE, 2009; NASEEM et al., 2009).

A alelopatia cumpre papel importante em ecossistemas agrícolas e nas coberturas de plantas entre as coberturas de culturas, plantas daninhas e árvores. Atualmente, é considerada como uma tecnologia potencial apropriada no controle de ervas daninhas utilizando as substâncias químicas liberadas por várias espécies vegetais (NASEEM et al., 2009). Em sistemas florestais, pode acarretar alterações em diversos aspectos ecológicos como, por exemplo,

na estrutura, composição e dinâmica de comunidades vegetais, bem como levar a supressão de espécies nativas (FERGUSON; RATHINASABAPATHI.; CHASE, 2003).

REFERÊNCIAS

- A cultura do urucum / Embrapa Amazônia Oriental. - 2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, Coleção Plantar 64, p. 61, 2009.
- ACHAKZAI, A. K. K. et al. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pak J. Bot.* 41 (5), 2129-2135, 2009.
- AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver mediumterm assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1687-1693, 2004.
- ALAM, S.M.; ISLAM, E.U. Effect of aqueous extract of leaf, stem and root of nettle leaf goosefoot and NaCl on germination and seedling growth of rice. **Pakistan Journal of Science and Technology** 1 (2): 47-52, 2002.
- ALONSO J. Tratado de Fitofarmacos y Nutraceuticos. Corpus Rosario, Argentina; 2004.
- ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Trends in annatto agroindustry: Bixin processing technologies and market. **Recent Patents Eng.** 5, 94_102, 2011.
- ALVES, R. W., SOUZA, A. A. U., SOUZA, S. M. A. G. U., JAUREGI, P. Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphrons (CGAs). **Sep. Purif. Technol.** 48, 208–213, 2006.
- ANDERSONW, S. G.; NAIR, M. G.; CHANDRA, A.; MORRISON, E. Supercritical fluid carbon dioxide extraction of annatto seeds and quantification of trans-bixin by high pressure liquid chromatography. **Phytochem Anal**, 8:247–9, 1997.
- ANISZEWSKI, T. The biological basis of quinolizidine alkaloids. **Sci. Legumes**. P. 11–24, 1994.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 1. ed. Hardbound, Finland: **Elsevier**, p. 61, 2007.
- ASGHARIPOUR, M.R.; ARMIN, M. Inhibitory effects of *Sorghum halepense* root and leaf extracts on germination and early seedling growth of widely used medicinal plants. **Advances in Environmental Biology** 4 (2): 316-324, 2010.

- ASHRAF, M. A. et al. Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. **In: Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress. Academic Press**, p. 153-167, 2018.
- BARROZO, M. A. S.; SANTOS, K. G.; CUNHA, F. G. Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. **Industrial crops and products**, v. 45, p. 279-282, 2013.
- BARTON, K. E. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and Trade-offs. **American Journal of Botany**, v.94, n.1, p.56–66, 2007.
- BITENCOURT, A. P. R. et al. Preparation of aqueous nanodispersions with urucum extract (*Bixa orellana* L.) using an organic solvent free and low energy method. **Food chemistry**, v. 257, p.196-205, 2018.
- BOLOGNESI, V. J.; GARCIA, C. E. R. Anatto carotenoids as additives replacers in meat products. **Alternative and Replacement Foods**, p. 355-384, 2018.
- CARVALHO, P. R. N. **Urucum- Histórico, situação atual e perspectivas**. Disponível em: Disponível em: <<https://www.ourucum.com.br>> acesso em: 03 de fevereiro de 2020.
- CARVALHO, P. R. N. **IBGE divulga dados sobre a safra de urucum 2016**. Disponível em: <<https://www.ourucum.com.br>> acesso em: 03 de fevereiro de 2020.
- CHAPARRO, J.M. et al. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **PLoS One** 8 (2), e55731, 2013.
- CHENGAI AH, B. et al. Medicinal importance of natural dyes a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 144-154, 2010.
- CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. *Plant Secondary Metabolites*. **Blackwell Publishers**, UK, 2006.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*, second ed., John Wiley and Sons Ltd. Chichester. New York, 2002.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**. v. 411, 843- 847, 2001.
- FABRI, E. G. Demanda por corantes naturais aquece mercado brasileiro de urucum. 2015. Disponível em:<https://www.sna.agr.br/demanda-por-corantes-naturais-aquece-mercado-brasileiro-de-urucum/>> acesso em: 03 de fevereiro de 2020.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. suppl 1, p. 69-75, 2001.

FANG, X.; YANG, C. M. A. Q.; YANG, L. X. Chen Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v.33, p. 53-64, 2011.

FERGUSON, J.; RATHINASABAPATHI, B.; CHASE, A. Allelopathy: How plants suppress other plants. **University of Florida**, p. 1–3, 2003.

FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. **J Am Oil Chem Soc**, 75:1723–7, 1998.

GALLAGE, N. J.; MOLLER, B. L. Vanilla: the most popular flavour. **Biotechnology of Natural Products**. Springer, p.3-24, 2018.

GARCIA, C. E. R. et al. Carotenoids bixin and norbixin from annatto (*Bixa orellana* L.) as antioxidants in meat products. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1510-1517, 2012.

GIULIANO, G., ROSATI, C., BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends Biotechnol.** 21 (12), 513–516, 2003.

GHIRALDINI, J. E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, Campinas, p. 20-25, 1989.

GIMÉNEZ, M.J. et al. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. **Food Chem.** 160, p. 226–232, 2014.

GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

HARBORNE, J. B. Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and related families. **Phytochemistry**,14:1331–7, 1975.

HENTY, E. E.; WOMERSLEY, J. S.; CONN, B. J. Handbooks of the flora of Papua New Guinea. **Melbourne University Press**, p. 276, 1981.

HERBERT, R. B. The Biosynthesis of Secondary. 2. ed., **Chapman and Hall**: London, 1989.

HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **Journal Science Food Agriculturae**. v.81, p. 842-852, 2001.

HUSSAIN, S. et al. Allelopathic potential of Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) on germination and seedling characters of some major cereal crops and their associated grassy weeds. **Pakistan Journal of Botany**, 39(4): 1145-1153, 2007.

INDERJIT; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529–39, 2003.

- INDERJIT K. et al. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology & Evolution**, v.26, n.12, p. 655-662, 2011.
- ISLAM, S.; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499, 2016.
- JONDIKO, I. JO.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochem.** v.41, n.31, p.59–62, 1989.
- KALLSCHEUER, N. et al. Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. p. 56:7–17, 2019.
- KANG, E. J., et al. Annatto usage and bleaching in dairy foods. **J. Dairy Sci.** v.93, n.9, p.3891–3901, 2010.
- LAURO, G. J. A primer on natural colours. **Cereal Food World**. v.36, p.949–53, 1991.
- LOBATO, K. B. S. et al. Characterization and evaluation of the stability of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, ed. 4, p. 3906-3912, 2013.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, v. 1, ed. 5, p. 80, 2008.
- MAJOLO, C.; CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **B.CEPPA**, Curitiba, v.31, n.1, jan/jun, 2013.
- MALCOVSKA, S.M. et al. Effect of silicon on growth, photosynthesis, oxidative status and phenolic compounds of maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium excess. **Water, Air Soil Pollut.** 225 (8), 1, 2014.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potential allelopathic of native species on germination and early growth of *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 61–69, 2006.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos.pdf. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **J Agric Food Chem**,45:1050–4, 1997.
- MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from Annatto. **Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants**, 92–101, 2001.

MEDINA-FLORES, D. et al. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L.(achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 400-403, 2016.

MOREIRA, P. A. et al. The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. **Economic Botany**, v. 69, n. 2, p. 127-135, 2015.

MOHAMADI, N.; RAJAIE, P. Effect of aqueous Eucalyptus (*E. camaldulensis* Labill) extracts on seed germination, seedling growth and physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Sorghum bicolor*. **Research Journal of Biological Sciences**. 4 (12): 1291- 1296, 2009.

NASEEM, M. et al. Allelopathic effects of sunflower water extract on weed control and wheat productivity. **Pakistan Journal of Weed Science Research**. 15(1): 107-116, 2009.

PEREIRA, D. M., VALENTÃO, P., PEREIRA, J. A., & ANDRADE, P. B. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules**. v.14, N.6, p. 2202–2211, 2009.

PIERPOINT, W.S. Why should plants make medicine – don't they do enough for mankind already? **Biochemistry (Lond)**, v. 22, p. 37-40, 2000.

PIER. Pacific Islands Ecosystems at Risk, US Forest Service. Honolulu, USA: HEAR, **University of Hawaii**. Disponível em: <http://www.hear.org/pier/index.html>. Atualizado em: 09 Mar. 2018. Acesso em: 25 Jan. 2020.

PINO, J. A.; CORREA, M. T. Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *J Essent Oil Res*, 15:66–7, 2011.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chem**, v.5,n.1, p.47–56, 1980.

RAGA, D. D.; ESPIRITU, R. A.; CHIEN-CHANG, S.; RAGASA, C. Y. A. Bioactive sesquiterpene from *Bixa orellana*. **J Nat Med**, 65:206–11, 2011.

RAO, R. S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n.2, p. 101–153, 2002.

RAO, P. P. et al. Characterisation of Seed Lipids from *Bixa orellana* and *Trachyspermum copticum*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 10, p. 1483-1490, 2015.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Allelopathy: Basic and Applied Aspects. London, **Chapman & Hall**. p. 480, 1992.

SINHA, K. et al. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 165-171, 2013.

- SCOTTER, M. J. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Addit. Contam.** 26 (8), 1123–1145, 2009.
- STOHS, S. J. Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. **Phytother Res.** v.28, n.7, p.956–60, 2014.
- SHILPI, J. A. et al. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108 p. 264–271, 2006.
- STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I.; COSTA, A. G. V. Anatto/Urucum - *Bixa orellana*. In: **Exotic Fruits**, p. 23-30, 2018.
- SMITH, A. C. et al. Flora Vitiensis nova: a new flora of Fiji (spermatophytes only). Volume 2. **Pacific Tropical Botanical Garden**, p. 818, 1981.
- TADEUSZ, A. Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. **Elsevier Science and Technology**, Oxford, UK, 2007.
- TAKSHAK, S; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 193, p.51-88, 2019.
- THAKUR, M. et al. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.12, p. 1–12, 2019.
- TIRIMANNA, A. S. L. Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. seeds by thin layer chromatography. **Mikrochim Acta**, II:11–6, 1981.
- VAN ETTEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. **Plant Cell**. v.6, p.1191–1192, 1994.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plantsecondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 2015.
- VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T. Fate of allelochemicals in the soil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 351-357, 1997.
- VILAR, D. A. et al. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. **Sci. World J.**, 1_11, 2014.
- VILLAR, R. et al. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. **Phytotherapy Research**, vol. 11, p. 441–445, 1997.
- WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. Manual of the flowering plants of Hawaii. Revised edition. Honolulu, Hawaii, USA: **University of Hawaii Press**, 1999.

WESTON, L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3–4, p. 367–389, 2003.

YANG L, STÖCKIGT J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural Products Reports**. 27:1469–79; 2010.

ZAYNAB, M. et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, 2018.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Bixa orellana* L. (URUCUM) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Lactuca sativa* L. (ALFACE)

POTENCIAL FITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Bixa orellana* L. (URUCUM) SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Lactuca sativa* L. (ALFACE)

Silva, Janaina R. ⁽¹⁾; Pádua, Lisandra C. S.; Costa-Maciel, Patrícia M. ⁽¹⁾; Albuquerque, Yuri A. P. ⁽¹⁾; Silva, Maria S. ⁽¹⁾; Brito, Nielson D. S. ⁽¹⁾; Souza, Carlos A. ⁽²⁾; Saraiva, Rogério A. ^{(1)*}

(1) Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Av. Gregório Ferraz Nogueira S/N, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil;

(2) Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Belo Jardim, Belo Jardim, Pernambuco, Brasil.

*Autor correspondente. Email: rogerioaqsaraiva@gmail.com, tel. +55 87 39293017

RESUMO

As espécies vegetais ao longo do tempo desenvolveram diversos mecanismos de resistência, como a produção de metabólitos secundários, para lidar com estresses tanto de origem biótico ou abiótico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. (alface). Em placas de Petri sementes de *Lactuca sativa* L. foram expostas a diferentes concentrações do EABO (25%, 50%, 75% e 100%) e aclimatadas em câmara de germinação BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25±2 °C, e acompanhadas durante sete dias. Após setes dias avaliações biométricas, número de sementes germinadas (NSG), índices de velocidade de germinação (IVG), vigor, índice de tolerância (IT), teor de clorofila a, b e totais, carotenoides e análises histoquímicas foram realizadas. Dentre os parâmetros avaliados a medida em que se aumentou as concentrações do extrato, todas as concentrações causaram efeitos fitotóxicos, sendo este mais intenso na concentração de 100% do EABO. O percentual de germinação, IV e IT foram afetados, bem como, uma redução no comprimento radicular foi observado. As concentrações do EABO afetaram também o conteúdo de clorofilas a e totais e carotenoides. Além disso, as plântulas sofreram alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Neste contexto, o extrato aquoso de *Bixa orellana* L. possui efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

PALAVRAS-CHAVE: Aleloquímicos, *Bixa orellana* L., fitotoxicidade, germinação.

ABSTRACT

Plant species over time have developed several resistance mechanisms, such as the production of secondary metabolites, to deal with stresses of both biotic and abiotic origin. The present study aimed to evaluate the phytotoxic potential of the aqueous extract of *Bixa orellana* L. leaves. (EABO) on the initial development of *Lactuca sativa* L. (lettuce). In Petri dishes, seeds of *Lactuca sativa* L. were exposed to different concentrations of EABO (25%, 50%, 75% and 100%) and acclimated in a BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) germination

chamber at 25±2 °C, and monitored for seven days. After seven days biometric evaluations, number of germinated seeds (NSG), germination speed index (IVG), vigor, tolerance index (IT), chlorophyll content a, b and totals, carotenoids and histochemical analyzes were performed. Among the parameters evaluated as the concentrations of the extract increased, all concentrations caused phytotoxic effects, which was more intense in the concentration of 100% of EABO. The germination percentage, IV and TI were affected, as well as, a reduction in root length was observed. EABO concentrations also affected the content of chlorophylls a and total and carotenoids. In addition, the seedlings underwent changes in the metabolism of carbohydrates and lipids. In this context, the aqueous extract of *Bixa orellana* L. has a phytotoxic effect on the initial development of *Lactuca sativa* L.

KEYWORDS: Allelochemicals, *Bixa orellana* L., germination, phytotoxicity.

INTRODUÇÃO

A alelopatia compreende um tipo de relação ecológica entre duas espécies de plantas no mesmo ambiente, onde uma delas pode interferir positiva ou negativamente sobre o desenvolvimento ou sobrevivência da outra (AMOO et al., 2008). Essa interferência ocorre graças à presença e liberação de metabólitos secundários denominados aleloquímicos (HASSAN et al., 2012). Estes aleloquímicos são utilizados pelas espécies vegetais como estratégias contra estresses bióticos e abióticos (BALLHORN et al., 2009), atuando na proteção contra microrganismos e predadores (ZAYNAB et al., 2018).

Estudos de alelopatia podem ajudar a compreender a relação de plantas daninhas ou invasoras nos sistemas agrofloretais ou em ambientes conservados, uma vez que estas plantas, além de serem capazes de modificar as relações ecológicas do ambiente, podem também prejudicar a produção agrícola ou promover extinção de espécies nativas, resultando na perda de biodiversidade (TIGRE et al, 2012). Além disto, plantas que apresentam potencial fitotóxico (isto é, quando seus aleloquímicos influenciam negativamente no desenvolvimento de outra planta) podem também ser apontadas como promissoras para a descoberta de novos herbicidas (ZAYNAB et al., 2018).

Bixa orellana L. (família Bixaceae), popularmente conhecida como urucueiro ou urucuzeiro, é uma planta arbustiva nativa da América tropical, mas bem difundida em todo o mundo. Sua semente é fonte do urucum, um pigmento alaranjado com grande aplicabilidade na indústria de alimentos e de cosméticos (MERCADANTE, 2001; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). Este corante natural apresenta dois carotenoides principais (bixina e norbixina), com ampla utilização na produção de condimentos, bebidas, laticínios, produtos cárneos e produtos para confeitaria (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; SCOTTER, 2009; CHENGAIHAH, et al., 2010; BITENCOURT et al., 2018).

B. orellana L. apresenta uma grande variedade de atividades biológicas como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngicas, neurofarmacológica e antibacteriana. Estudos relatam que extratos de suas folhas, raízes, caule e sementes são amplamente utilizadas para fins medicinais (SHILPI et al., 2006; ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). O extrato das folhas é utilizado no tratamento de picadas de cobra, tosse, entre outras (FABRICANT; FARNSWORTH. 2001) e capaz de inibir o crescimento de bactérias como a *Escherichia coli* (SHILPI et al., 2006).

A produção de sementes de urucum é maior na América Latina (Brasil, Peru, Bolívia, Equador, México, Colômbia, Jamaica), seguida por África (Quênia) e Ásia (Índia e Filipinas), enquanto que os Estados Unidos, Japão e Europa são os maiores consumidores. Em 2009, a área cultivada de urucuzeiro tinha um total de 11707 ha e a produção de sementes de urucum atingiu 12472 toneladas (ALBUQUERQUE & MEIRELES, 2011; RADDATZ-MOTA, 2017; STRINGHETA, 2018).

Apesar de ser nativa da América continental e amplamente introduzida em todos os demais continentes com fins econômicos, *B. orellana* tem status de planta invasora em várias ilhas do Pacífico, como Havaí, Fiji, Papua Nova Guiné, Ilhas Christmas, Ilhas Cook, Polinésia

Francesa, Nova Caledônia e Ilhas Galápagos (HENTY et al, 1981; SMITH et al. 1981; WAGNER et al. 1999; PIER, 2018).

Mesmo esta espécie apresentando uma importância econômica e medicinal significativa, o conhecimento sobre seu potencial fitotóxico e sua interferência no desenvolvimento de outras espécies vegetais é ainda escasso na literatura, abrindo espaço para novas investigações. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico do extrato aquoso de folhas de *Bixa orellana* L. sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Folhas maduras de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) foram coletadas na fazenda Umburana, município de Orocó-PE (8°33'49,6" S; 39°30'06,6" W), armazenadas em caixas de papelão para o transporte até a Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST). Uma exsicata da planta foi preparada, identificada por taxonomista e depositada no Herbário do Semiárido do Brasil (HESBRA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob o número 03838.

2.2 Obtenção do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO)

As folhas de urucuzeiro foram previamente higienizadas e lavadas em água corrente, a drenagem ocorreu a temperatura. Posteriormente, 200 g do material vegetal fresco foram pesadas. Em um liquidificador, o material vegetal foi triturado em 2000 mL de água destilada.

O extrato aquoso obtido passou por duas filtrações para separação total das partículas, a primeira em peneira e a segunda filtração em bomba a vácuo para obtenção do extrato aquoso bruto das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO). O material foi alocado em frascos âmbar e armazenados em refrigeração a -20°C para análises posteriores.

2.3 Prospecção fitoquímica qualitativa do EABO

O EABO foi primeiramente submetido a banho ultrassônico durante 30 minutos. Posteriormente, sua caracterização fitoquímica qualitativa foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Matos (1988; 1997), a qual consiste em reações químicas com formação de precipitado, espuma e mudança de coloração para identificação de várias classes de metabólitos secundários, como descritos a seguir:

a) Compostos fenólicos

Uma gota do EABO foi gotejada na superfície de um papel filtro, seguida de uma gota da solução de FeCl_3 2% e analisado sob luz ultravioleta (UV). O aparecimento de uma coloração azul escuro fluorescente indica a presença de compostos fenólicos.

b) Flavonoides

Uma gota do EABO foi aplicada sobre uma folha de papel filtro e logo após, uma gota de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5% foi acrescentada sobre a amostra. As amostras foram analisadas sob luz UV para identificar o aparecimento ou não da cor amarela fluorescente, indicando a presença deste metabólito.

c) Antocianidinas e Chalconas

Em três tubos de ensaio, 1 mL do extrato foi adicionado. Em seguida, a amostra do tubo 1 foi acidificada a pH 3,0 com a adição de HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, e os tubos 2 e 3 alcalinizados a pH 8,5 e 11,0, respectivamente, através da adição de NaOH a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Alterações na

coloração das soluções nas cores vermelha, lilás e azul púrpura nos tubos 1, 2 e 3, respectivamente, indicam a presença de antocianidinas e a coloração vermelha nos tubos 1 e 3 apontam a presença de chalconas.

d) Flavonas:

Em uma placa de Elisa adicionou-se 150 μL do EABO e um pedaço de fita de magnésio metálico foi acrescentada, seguido de uma gota de HCl concentrado. Ao final da reação (fim da efervescência), a coloração deve ser observada, na qual a presença da cor vermelha é um indicativo da presença de flavonas.

e) Alcaloides:

Em uma placa de Elisa, 150 μL da amostra foi adicionado a dois poços. Em seguida, 50 μL do reagente Dragendorff foi acrescentado em cada poço contendo o extrato. Em um terceiro poço, foram alocados 150 μL do reagente Dragendorff para comparação (controle). A formação de um precipitado de coloração laranja sugere a presença de alcaloides.

f) Saponinas:

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da amostra e 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado durante 5 minutos (com auxílio de um vortéx) e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente indica a presença de saponinas.

g) Cumarinas:

Em uma folha de papel filtro o extrato foi gotejado e uma gota da solução de KOH 10% foi adicionada em sequência. A coloração azul sob luz UV aponta a presença de cumarinas.

h) Antraquinonas:

Adicionou-se 150 μL do extrato em poços da placa de Elisa e 50 μL de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 mol.L^{-1} foi acrescentado posteriormente. A presença da cor vermelha indica a presença destes metabólitos.

i) Triterpenoides e Esteroides:

Foram adicionados 150 µL do EABO em um poço de uma placa de Elisa, seguida da adição de uma gota de anidrido acético e de duas gotas de ácido sulfúrico. A presença de coloração azul-esverdeada indica a presença de esteroides e a cor vermelha triterpenoides.

j) Taninos:

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL do extrato foi adicionado e uma solução de gelatina 2,5% foi gotejada. A formação de precipitado branco demonstra a presença de taninos.

l) Leucoantocianidinas e Catequinas:

Em um tubo de ensaio, 1 mL do extrato foi acidificado utilizando HCl 0,5 mol.L⁻¹ (pH 3). Posteriormente o tubo foi aquecido (em bico de Bunsen). A presença da coloração vermelha indicaria a presença de leucoantocianidinas e amarela catequinas.

2.4 Ensaio de germinação de alface na presença do extrato aquoso de folhas de *B. orellana* L.

Todo material necessário para montagem do experimento foi previamente esterilizado em autoclave a 125 °C por 15 minutos e, em seguida, levados para uma estufa de circulação forçada de ar a 60 °C até que todo material estivesse seco. A seguir, todo o material foi organizado em uma capela de fluxo laminar, onde a semeadura foi realizada, com intuito de evitar possíveis contaminações.

Concentrações do extrato aquoso de folhas de *B. orellana* L. (EABO) foram definidas através da diluição do extrato em água destilada para obtenção de proporções distintas de EABO: água, correspondendo a 25% v/v (1 parte de EABO para 3 partes de água), 50% (1 parte de EABO para 1 parte de água), 75% (3 partes de EABO para 1 parte de água), 100% (somente EABO). O grupo controle consistiu apenas de água destilada.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), no qual consistiu em cinco tratamentos e quatro repetições cada. Em placas de Petri, previamente esterilizadas e contendo uma folha de papel filtro qualitativo como substrato, 25 sementes de alface (cultivar Mônica SF 31, Feltrin®, Farroupilha, Brasil) previamente esterilizadas em hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos, foram semeadas. Adicionou-se 3 mL das respectivas concentrações de EABO 25%, 50%, 75% e 100% para cada tratamento e 3 mL de água destilada para o grupo controle (EABO 0%). As placas foram isoladas em plástico filme e levadas para a câmara de germinação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (MA-1402/546), com fotoperíodo controlado de 12 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por sete dias. Diariamente, o número de sementes germinadas em cada tratamento foi avaliado. No sétimo dia do experimento, seis plântulas de cada placa referente as concentrações adotadas foram selecionadas aleatoriamente para análises biométricas, no qual mensurou-se o comprimento da radícula e hipocótilo com o auxílio software Image Pro Plus® para posterior análise dos parâmetros descritos no item 2.7.

2.5 Índices de desenvolvimento e fitotoxicidade

2.5.1 Número de sementes germinadas (NSG/Dia) e Índice de velocidade de germinação (IVG)

O acompanhamento da germinação foi iniciado 24 horas após a semeadura e se estendeu por sete dias. A influência do EABO foi avaliada de acordo com sua capacidade de inibir ou retardar a germinação de *L. sativa*. Sementes que apresentaram emergência de radícula ≥ 1 mm foram consideradas germinadas. A relação entre o número de sementes germinadas em cada tratamento, para os dias observados (0 a 7 dias) foi estabelecida, bem

como, determinou-se o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de acordo com a fórmula abaixo (MAGUIRE, 1962; WARDLE et al, 1991):

$$IVG = \sum \frac{ng}{d}$$

Onde, ng = número de sementes germinadas e d = dia observado

2.5.2 Índice de Vigor

O vigor das plântulas foi determinado, segundo a fórmula proposta por Abdul-Baki e Anderson (1973):

$$\text{Vigor} = Ct \times ng$$

Onde: Ct = Comprimento total das plântulas e ng = número de sementes germinadas

2.5.3 Índice de tolerância (IT) ao EABO

O Índice de Tolerância (IT) ao EABO foi determinado através dos dados de comprimento radicular das plântulas de *L. sativa* L., após os sete dias, por meio da fórmula proposta por Cox e Hutchinson (1979):

$$IT = 1 + \log \frac{C_E}{C_o}$$

C_E: comprimento esperado (controle) e C_O: comprimento observado nos tratamentos.

2.6 Presença de necrose

A necrose foi detectada a partir da identificação de manchas escuras sobre a radícula ou sobre a folha cotiledonar, o que indica morte celular na região afetada. Para cada réplica, determinou-se o número de plântulas com necrose radicular ou na folha cotiledonar, calculando o percentual em relação ao total de plântulas da réplica.

2.7 Parâmetros físico-químicos

As determinações de pH e condutividade elétrica (CE) foram realizadas usando um medidor de pHmetro e um condutivímetro, respectivamente. A partir dos valores de CE (em dS.m⁻¹), o potencial osmótico (Ψ_o , em MPa) foi determinada de acordo com a fórmula proposta por Ayers e Westcot (1999):

$$\Psi_o = -0,036 \times CE$$

2.8 Teor de Clorofilas e Carotenoides

Com auxílio de um bisturi, as folhas cotiledonares de todas as plântulas para cada tratamento foram separadas, pesadas e alocadas em tubos de ensaio, previamente identificados e protegidos com papel alumínio. Em seguida, 4 mL de acetona 80% (VETEC, Brasil) foram adicionados em todos os tubos e acondicionados no refrigerador durante sete dias para extração dos pigmentos fotossintéticos.

Após o tempo de extração, alíquotas do extrato obtido foram utilizadas para realizar a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm. As concentrações de clorofilas e de carotenoides (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram, então, calculadas de acordo com a metodologia proposta por Lichthenthaler, (1987), seguintes formulas:

$$\text{Clorofila } a = C_a = 12,25 A_{663,2} - 0,279 A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila } b = C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

$$\text{Carotenoides (xantofilas + carotenos)} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

Os resultados foram expressos na quantidade em μg de clorofilas e carotenoides por grama de massa fresca analisadas em cada tratamento.

2.9 Análise Histoquímica

Plântulas do grupo controle e tratadas com o extrato aquoso de folhas de *B. orellana* L. na concentração de 100% foram fixadas em FAA 50 % (Formaldeído 37%, Álcool etílico 50 % e Ácido acético glacial) por 72h e estocadas em álcool 70 % (JOHANSEN, 1940). Posteriormente, estas foram divididas em radícula e folha cotiledonar e emblocadas em resina sintética (kit Historesina - hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Os blocos foram colados em um suporte de madeira e, em seguida, foram seccionados com micrótomo semiautomático, com cortes de espessura de 5 μm . As amostras foram coradas com azul de toluidina (para identificação de compostos fenólicos e pectinas) (BAKER 1966; RAMALINGAN e RAVINDRANATH, 1970; DMITRUK et al., 2019), lugol (para identificação de amido) e Sudan III (para identificação de lipídios) (JOHANSEN, 1940). Todas as amostras foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas com câmera CMOS digital acoplada.

2.10 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média ou desvio padrão, quando apropriado. Quando paramétricos, os dados foram submetidos análise de variância (ANOVA) de um fator seguidos do teste de Tukey. Quando não-paramétricos, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn. Em todas as análises, a diferença entre as medias foram consideradas significativas a $p < 0,05$. Para a realização das análises o software GraphPad Prism 6 e o R studio foram utilizados.

3 RESULTADOS

3.1 Perfil Fitoquímico do EABO

A tabela 1, mostra que o teste de prospecção fitoquímica indicou a presença de metabólitos secundários, evidenciando a presença de flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, cumarinas e triterpenóides. Onde, detectou-se ainda uma maior intensidade de alguns aleloquímicos.

3.2 Parâmetros Físico-químicos: pH, condutividade elétrica e Pressão osmótica do EABO

As características físico-químicas apresentadas pelo extrato das folhas de *B. orellana* L. em diferentes concentrações são mostradas na Tabela 2. Foi observado uma estreita faixa de pH nos extratos, em comparação ao controle (variando entre 5,79-4,39), enquanto que a

condutividade elétrica demonstrou aumento significativo e a pressão osmótica um declínio à medida que se elevou as concentrações do EABO.

3.3 Índices de Desenvolvimento e Fitotoxicidade

De acordo com as observações relacionadas ao número de sementes germinadas por dia, todos os tratamentos apresentaram radículas emergidas (≥ 1 mm de comprimento) em 24 horas após o início do experimento. No entanto houve uma redução no número de sementes germinadas (NSG) conforme aumentou a concentração do EABO. Quando comparado ao controle, a concentração 25% não foi significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, foi possível notar um retardo de 66,18%, 94,12% e 97,06% nas concentrações 50, 75 e 100%, respectivamente (Figura 1). A partir do terceiro dia, a NSG se estabilizou para todos os tratamentos ($p > 0,05$).

É possível observar na Tabela 3 uma redução no IVG à medida em que as concentrações de EABO foram aumentando, atingindo 48,92%, 65,66% e 66,19% de redução, respectivamente aos tratamentos EABO 50, 75 e 100%. No entanto, não houve diferença entre o controle e a concentração de 25% de EABO. Este comportamento também foi observado no vigor das plântulas de alface, entretanto, ocorreu de forma mais relevante no tratamento de concentração 100% (59,62%) do extrato. O índice de tolerância ao EABO indicou que, a partir da concentração EABO 25%, as plântulas de alface já apresentam sensibilidade significativa.

As plântulas demonstraram crescimento irregular (Figura 3) em relação ao comprimento total, sendo possível observar uma redução no tamanho da radícula, evidenciando um encurtamento em virtude das concentrações de extrato adotada. Em decorrência disso, comprovou-se uma redução em média de 54,45% no comprimento da radícula das plântulas submetidas a concentração de 100% do EABO, quando comparadas ao

grupo controle, evidenciando um comportamento do tipo dose-resposta (Figura 2.A). No entanto, a parte aérea não exibiu modificações em relação ao comprimento total (Figura 2.B), diante das concentrações de EABO testadas.

Durante as avaliações da integridade das plântulas expostas a diferentes concentrações de EABO, observou-se a presença de necrose nas radículas e folhas cotiledonares apenas nas concentrações maiores do EABO (75% e 100%). (Figura 4).

3.4 Teor de Clorofilas e Carotenoides

Na Tabela 4 quanto ao conteúdo de clorofila a e totais, os dados mostram que houve uma redução significativa nas concentrações 75% (29,73% e 30,71%) e 100% (26,8% e 27,84%) do extrato, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos no conteúdo de clorofila b.

O conteúdo de carotenoides apresentou uma redução nas concentrações de 50, 75 e 100% do EABO, ocorrendo de forma mais acentuada nas concentrações de 75% (75,48%) e 100% (75,05%). Por outro lado, o oposto foi observado na concentração de 25%, na qual ocorreu um aumento de 22,31%, atingindo $138,36 \mu\text{g.gMF}^{-1}$ de carotenoides (Tabela 4).

3.5 Características anatômicas e histoquímicas de plântulas de alface sobre influência do EABO para detecção de compostos fenólicos, amido e lipídeos

Quanto as estruturas anatômicas das plântulas de alface sobre influência ou não do EABO, foi possível observar que não houve alteração entre os tratamentos, nos quais os tecidos dérmicos, fundamental e vascular foram observados. No sistema radicular, observou-se a epiderme, o cortéx, periciclo e os vasos condutores, xilema e floema (Figura 5A, B). Nas folhas cotiledonares observou-se a presença de estômatos na epiderme abaxial e adaxial

(característica anfiestomática), células do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Notou-se ainda, que os espaços intercelulares diminuíram à medida que se aumentou a concentração do extrato (Figura 6A, B).

Ao verificar os cortes histológicos das folhas cotiledonares das plântulas coradas com azul de toluidina (figura 6-A e 6-B), é possível verificar que a amostra da folha cotiledonar do controle apresentou coloração azul em estruturas como parede celular e citoplasma, mas os vacúolos dos parênquimas esponjosos são evidenciados sem coloração (figura 5-A). Por outro lado, a amostra da folha cotiledonar do EABO 100% apresentou coloração verde intensa, chamando a atenção para os vacúolos dos parênquimas eponjosos também com coloração verde (figura 6-B). Essa análise sugere um aumento significativo na concentração de compostos fenólicos nos vacúolos das células parenquimáticas das folhas cotiledonares de plântulas de alface tratadas com EABO. Quando analisadas os cortes histológicos das radículas, verifica-se que não há mudanças na coloração nem estruturais significativas entre elas (5-A, 5-B).

Para a atividade do lugol, foi observado a presença de amido em todos os tratamentos independentemente da parte da planta analisada (radícula ou folha). No entanto, nas folhas, houve um aumento no acúmulo de amido nas células quando comparado com o controle, na concentração mais elevada do extrato (100%) (figura 6C, D). Já na radícula o acúmulo de amido foi muito baixo, independente da concentração (Figura 5C, D).

Em relação a atividade do sudan III, foi possível observar que em todos os tratamentos houve acúmulo de lipídeos nas folhas. Entretanto, este acúmulo de lipídeos foi observado mais próximo a epiderme à medida que se aumentava as concentrações do extrato, formando, em alguns casos, uma fina camada lipídica ao entorno da epiderme, principalmente na região abaxial da folha (Figura 6E, F). Nas radículas também houve a acúmulo de amido foi muito baixo, independente da concentração (Figura 5E, F).

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelam que o extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO), reduziu a porcentagem de germinação, afetou significativamente o comprimento radicular de plântulas de *Lactuca sativa* L. à medida que se aumentou as concentrações do extrato, e induziu o acúmulo de amido e lipídeos nos tecidos vegetais. Evidenciando assim o potencial fitotóxico do EABO sobre o desenvolvimento inicial de alface.

Os aleloquímicos estão presentes nos vegetais nas folhas, raízes, cascas, flores, frutos, e sua liberação também pode ocorrer como exsudatos radiculares e/ou compostos voláteis (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004). As análises indicaram a presença de flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, saponinas, cumarinas e triterpenóides no EABO. A literatura evidencia a presença de estudos comparativos de extratos vegetais quanto à sua composição química, no qual a presença dos metabólitos saponinas, taninos, alcalóides, bem como, alguns fenóis, compostos majoritários em determinados extratos aquosos, devido a capacidade deste solvente em interagir com diversas moléculas polares (TIWARI et al., 2011; KUBILIENE et al., 2018). Quanto aos componentes isolados, nas folhas de urucum já foi relatado que há presença de terpenos como α -carpofileno, α -copaeno, α -elemeno e cis-ocimeno (STOHS, 2014) e outros tantos compostos como, por exemplo, fitol, stigmasterol, sitosterol (RAGA et al., 2011), leucocianidina, ácido elágico, luteolina e apigenina (HARBORNE, 1975).

De acordo com os estudos de Qin et al (2006), o ácido elágico é um aleloquímico capaz de inibir o peso fresco, a elongação da raiz em concentrações entre 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em *Arabidopsis thaliana*. Este resultado corrobora com nosso estudo, no qual observamos inibição e encurtamento radicular. O que pode está diretamente relacionado a presença de

compostos fenólicos. A apigenina e a luteolina causam uma diminuição nos parâmetros de germinabilidade e crescimento radicular (BASILE et al., 2003). Embora estes compostos não tenham sido detectados no presente estudo.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, é sabido que são extremamente importantes na condução dos processos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos. A respeito da condutividade elétrica, ela nos permite saber sobre a concentração de eletrólitos, bem como à quantidade de minerais dissolvidos na água (NAZIR et al., 2015). Uma vez, que a condutividade elétrica aumenta e/ou o potencial osmótico diminui, a disponibilidade de água nas raízes é reduzida, o que pode acarretar na inibição do crescimento vegetal (VAN IEPEREN, 1996). Segundo Gatti, Perez e Lima (2004), o pH ideal para a germinação de plantas deve estar entre 4 e 7 e o potencial osmótico deve ser menor que -0,2 MPa, como observado no presente estudo. Tal comportamento foi observado em nosso estudo, entretanto, considerando os dados obtidos, podemos afirmar que os parâmetros físico-químicos analisados parecem não estar envolvidos diretamente na fitotoxicidade do EABO. É sabido que o volume dos vacúolos de células da raiz sofre alteração de volume em função da pressão osmótica (ANDREEV, 2012).

Diversos produtos químicos alelopáticos, como a catequina, por exemplo, afetam mais drasticamente a germinação de sementes do que o crescimento e viabilidade de plantas adultas (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004). Além disso, o comprimento radicular expressa os efeitos fitotóxicos secundários ocasionados por aleloquímicos, devido à elevada sensibilidade das raízes primárias e por estarem em contato direto com o extrato (OLIVEIRA e CAMPOS, 2006). Segundo Weir, Park e Vivanco (2004), a respiração mitocondrial provavelmente é, em parte, um dos mecanismos que ocasiona a inibição da germinação de sementes, uma vez que, durante esta fase, ocorre um rápido aumento da atividade glicolítica, bem como, aumento na taxa respiratória. Essa atividade é necessária para mobilizar carboidratos armazenados para

fornecer às sementes o poder redutor, o ATP e os produtos de carbono, indispensáveis para a biossíntese das raízes e partes aéreas das mudas emergentes (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004).

Um dos possíveis fatores da fitotoxicidade do EABO em nosso estudo, foi a redução nos pigmentos fotossintetizantes. A redução na síntese de clorofila é considerada uma resposta comum das plantas a aleloquímicos, e isso pode ser uma resposta subsequente da planta a esses produtos químicos, além de danos celulares. Os aleloquímicos afetam adversamente a biossíntese e o acúmulo de clorofila, interferindo na biossíntese e/ou destruição da clorofila. Os próximos efeitos negativos desses processos seriam retardadores da fotossíntese e do fraco crescimento das plantas (TANVEER et al., 2008; BENYAS et al., 2010).

Estudos realizados com diferentes variedades de trigo demonstraram que a concentração de clorofila apresentou comportamento crescente e decrescente ao estresse alelopático de *Avena fatua*, *Melilotus officinalis* e *Polypogon hissaricus*, plantas daninhas (SIYAR et al., 2019). Já em estudos anteriores, foi observado uma redução na concentração do conteúdo de clorofila foliar, o crescimento de plântulas de lentilha quando extratos aquosos (0,5% a 2%) de *Xanthium strumarium* foram aplicados (BENYAS et al., 2010). Evidenciando que a medida em que se aumenta a concentração do extrato o conteúdo de clorofilas reduz, como observado no presente trabalho em plântulas de alface tratadas com diferentes concentrações do EABO. Este comportamento provavelmente aconteceu pela presença de danos celulares e anormalidade biossintéticas no fotossistema desencadeados pelos aleloquímicos presentes no extrato (SIYAR et al., 2019).

O corte histológico corado com azul de toluidina revelou um aumento significativo na quantidade de compostos fenólicos na folha cotiledonar de plântulas de alface expostas ao EABO (mas não nas radículas), em especial todo o conteúdo dos vacúolos reagiu com o

corante, evidenciando uma cor verde intensa (diferentemente do controle, onde o interior do vacúolo não foi corado e as estruturas demonstraram tonalidade azul). Isso é possível porque o corante azul de toluidina possui metocromasia verde na presença de compostos fenólicos (RAMALINGAM e RAVINDRANATH, 1970). Ainda de acordo com Ramalignam e Ravindranath (1970), as substâncias p-cresol, pirocatecol, 4-metil catecol, resorcinol, naftocresol e pirogalol conseguem ser coradas de verde.

Na literatura é relatado que alguns estresses abióticos são capazes de induzir o acúmulo de compostos fenólicos (substâncias com atividade antioxidante) nos vacúolos de células do parênquima esponjoso foliar. Santiago et al (2000) observaram o acúmulo de compostos fenólicos nos vacúolos foliares de quebra-pedra (*Phyllanthus tenellus*) em resposta à exposição ao sulfato de cobre. Em alface também se observou o aumento de compostos fenólicos com atividade antioxidante nos vacúolos foliares em resposta ao estresse hídrico (OH et al., 2009a; OH et al., 2009b) e à incidência de radiação ultravioleta (LEE et al., 2014). Também é evidenciado na literatura que, diante desses estresses abióticos, o alface aumenta a expressão e a atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), enzima chave na via de biossíntese dos compostos fenólicos. Diante destes fatos, acreditamos que os aleloquímicos do EABO desempenham papel semelhante na ativação da PAL para a biossíntese de compostos fenólicos e consequente acúmulo vacuolar, como mecanismo de defesa e proteção da planta. Por fim, a presença de necrose na folha cotiledonar (fig. 4-C) pode estar relacionada com o aumento da deposição de compostos fenólicos no mesofilo foliar, como revelado nos cortes histológicos corados com azul de toluidina (ZOBEL e NEGHSWANDER, 1990), bem como pode está associado a redução do crescimento das plântulas de alface observado neste estudo.

Outro fator da fitotoxicidade do EABO evidenciado no presente trabalho foi o aumento no acúmulo de amido nas folhas de alface submetidas a concentrações distintas. É

relatado na literatura que há aumento no acúmulo de amido quando espécies vegetais estão sob estresse (THALMANN e SANTELIA, 2017), como por exemplo, a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (SIAUT et al., 2011) e o halófito *Thellungiella halophila* (WANG et al., 2013). O amido é considerado a principal fonte de armazenamento de carboidratos fundamental para a aptidão das plantas (SANTELIA e ZEEMAN, 2011; LIU et al., 2019), e seu metabolismo geralmente exhibe plasticidade em resposta a condições ambientais (LIU et al., 2019). Está comumente associado a órgãos de armazenamento, como raízes, rizomas, tubérculos, caules e sementes. Nestes órgãos são sintetizados a partir da sacarose transportada podendo ser armazenado, fornecendo alimento para o crescimento e/ou estabelecimento de mudas na fase de crescimento do vegetal (THALMANN e SANTELIA, 2017). Ainda de acordo com os autores supracitados, o amido é sintetizado nas células fotossintéticas usando principalmente uma fração do carbono fixado a partir de CO₂ e armazenado temporariamente nos cloroplastos. Sendo ele sintetizado e/ou degradado em um curto espaço de tempo, e suas vias variam de acordo com o tipo de célula a partir do qual é derivado e as condições ambientais externas.

No presente estudo também foi observado a presença da produção de lipídeos nas plântulas de todos os tratamentos principalmente naqueles referentes as concentrações mais elevadas do EABO. Este provavelmente é um dos mecanismos que as espécies vegetais possuem de fitoproteção para tolerar as a ação do agente estressor (SCHNEIDER et al., 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que o extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. possui efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L., afetando a velocidade

de germinação, vigor, índice de tolerância, comprimento da radícula, bem como o conteúdo de clorofilas a e totais e carotenoides.

Evidenciou a presença de compostos fenólicos, flavonóides e cumarinas no extrato aquoso de *Bixa orellana* L., que contribuíram para o efeito fitotóxico do extrato em plântulas de alface. As diferentes concentrações do extrato provocaram acúmulo de compostos fenólicos na folha, amido e lipídeos nos tecidos vegetais. Com isso, se faz necessário a realização de estudos visando elucidar a influência dos aleloquímicos presentes no EABO sobre o desenvolvimento inicial de alface, e os mecanismos moleculares pelos quais os efeitos observados neste estudo ocorrem.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão das bolsas e equipamentos; à UFRPE pelo Edital PRPPG 015/2018 (Apoio à pesquisa institucional da UFRPE), ao Grupo de Instrumentação e Análise Química (GIAQ - UAST/UFRPE), aos Programas de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PGPV - UAST/UFRPE) e de Biodiversidade e Conservação (PGBC – UAST/UFRPE), ao Herbário do Semiárido do Brasil (HESBRA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

7 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

8 REFERÊNCIAS

ABDUL BAKI, A.A; ANDERSON, J. D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Sci.** 13:630-633, 1973.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Trends in annatto agroindustry: Bixin processing technologies and market. **Recent Patents Eng.** 5, 94_102, 2011.

AMOO, S.O.; OJO, A.U.; VAN STADEN, J. Allelopathic potential of Tetrapleura tetraptera leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 149–152, 2008.

Andreev, I. M. Role of the vacuole in the redox homeostasis of plant cells. **Russian journal of plant physiology**, 59(5), 611-617, 2012.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. Water quality for agriculture. Roma: FAO (Irrigation and Drainage Paper, 29), p.97, 1999.

BALLHORN, D. J.; KAUTZ, S.; HEIL, M.; HEGEMAN, A. D. Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. **Public Library Of Science**, v. 4, n. 5, p. e5450, 2009. BASILE, A.; SORBO, S.; LOPEZ-SAEZ, J. A.; COBIANCHI, R. C. Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* HEDW.(Bryophyta) and *Raphanus sativus* L.(Magnoliophyta). **Phytochemistry**, 62(7), p.1145-1151, 2003.

BENYAS, E. et al. Allelopathic effects of *Xanthium strumarium* L. shoot aqueous extract on germination, seedling growth and chlorophyll content of lentil (*Lens culinaris* Medic.). **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 3, p. 5223-5228, 2010.

BITENCOURT, A. P. R. et al. Preparation of aqueous nanodispersions with urucum extract (*Bixa orellana* L.) using an organic solvent free and low energy method. **Food chemistry**, v. 257, p.196-205, 2018.

CHENGAIHAH, B. et al. Medicinal importance of natural dyes a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 144-154, 2010.

COX, R. M.; HUTCHINSON, T. C. Metal co-tolerances in the grass *Deschampsia cespitosa*. **Nature**, v. 279, n. 5710, p. 231, 1979.

DMITRUK, M., SULBORSKA, A., ŻURAW, B., STAWIARZ, E., & WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E. Sites of secretion of bioactive compounds in leaves of *Dracocephalum moldavica* L.: anatomical, histochemical, and essential oil study. **Brazilian Journal of Botany**, 42(4), 701-715, 2019.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. suppl 1, p. 69-75, 2001.

- GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Aristolochiae speranzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasílica* 18(3):459-470, 2004.
- GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends Biotechnol.** 21 (12), 513–516, 2003.
- HASSAN, M. M. et al. Allelopathic effects of some botanical extracts on germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* L. **Journal of Agricultural Technology** 8(4): 1423-1469, 2012.
- HENTY, E. E.; WOMERSLEY, John S.; CONN, Barry J. **Handbooks of the flora of Papua New Guinea.** Melbourne University Press, 1981, 276 p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** Bombay: Tata McGraw-Hill Book Company, p. 523. 1940.
- KUBILIENE, L. et al. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: Antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LEE, M. J.; SON, J. E.; OH, M. M. Growth and phenolic compounds of *Lactuca sativa* L. grown in a closed-type plant production system with UV-A,-B, or-C lamp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(2), p.197-204, 2014.
- LICHTHENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L., DOUCE, R. (Eds.) **Meth Enzimol.**148, 350-382, 1987.
- LIU, K. et al. Young seedlings adapt to stress by retaining starch and retarding growth through ABA-Dependent and -independent pathways in Arabidopsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 515, 699-705, 2019.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 128, 1988.
- MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 141, 1997.
- MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from Annatto. **Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants**, 92–101, 2001.
- NAZIR, R. et al. Accumulation of heavy metals (Ni, Cu, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe) in the soil, water and plants and analysis of physico-chemical parameters of soil and water collected from Tanda Dam kohat. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Researched**, 7, 89-97, 2015.

OH, M. M.; TRICK, H. N.; RAJASHEKAR, C. B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal of plant physiology**, 166(2), p.180-191, 2009.

OH, M. M.; CAREY, E. E.; RAJASHEKAR, C. B. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47(7), p.578-583, 2009.

PIER. Pacific Islands Ecosystems at Risk, US Forest Service. Honolulu, USA: HEAR, University of Hawaii. Disponível em: <http://www.hear.org/pier/index.html>. Atualizado em: 09 Mar. 2018. Acesso em: 25 Jan. 2020.

QIN, B. et al. Phytotoxic allelochemicals from roots and root exudates of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Plant signaling & behavior**, 1(6), p.323-327, 2006.

RADDATZ-MOTA, D., PÉREZ-FLORES, L. J., CARRARI, F., MENDOZA-ESPINOZA, J. A., DE LEÓN-SÁNCHEZ, F. D., PINZÓN-LÓPEZ, L. L., ... & RIVERA-CABRERA, F. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of food science and technology**, 54(6), 1729-1741, 2017.

RAMALINGAM, K.; RAVINDRANATH, M. H. Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue. **Histochemie**, 24(4), p.322-327, 1970.

SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P.; DE OLIVEIRA, D. E. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. **Annals of Botany**, 86(5), p.1023-1032, 2000.

SIYAR, S. et al. Allelopathic effect of aqueous extracts of three weed species on the growth and leaf chlorophyll content of bread wheat. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 63-68, 2019.

SHILPI, J. A. et al. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108 p. 264–271, 2006.

SCHNEIDER, J.; LABORY, C.R.G.; RANGEL, W.M.; ALVES, E., GUILHERME, L.R.G. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, 262, 1245–1258, 2013.

SCOTTER, M. J. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Addit. Contam.** 26 (8), 1123–1145, 2009

SMITH, A. C. et al. **Flora Vitiensis nova: a new flora of Fiji (spermatophytes only)**. Volume 2. Pacific Tropical Botanical Garden, 1981, 818 p.

STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I.; COSTA, A. G. V. Anatto/Urucum - *Bixa orellana*. In: **Exotic Fruits**, p. 23-30, 2018.

TANVEER, A. et al. Allelopathic effects of *Xanthium strumarium* L. on seed germination and seedling growth of crops. **Allelopathy Journal**, v. 21, n. 2, p. 317-327, 2008.

TIGRE, R.C.; SILVA, N.H.; SANTOS, M.G.; HONDA, N.K.; FALCAO, E.P.S.; PEREIRA, E.C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 461 84. p. 125-132, 2012.

TIWARI, P., KUMAR, B., MANDEEP, K., KAUR, G., & KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

VAN IEPEREN, Ws. Dynamic effects of changes in electric conductivity on transpiration and growth of greenhouse-grown tomato plants. **Journal of Horticultural Science**, 71, 3, 481-496, 1996.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawaii**. Revised edition. Honolulu, Hawaii, USA: University of Hawaii Press, 1999.

WARDLE, D. A.; AHMED, M.; NICHOLSON, K. S. Allelopathy influence of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) seeds on germination and radicle growth of pasture plants. *New Zealand J. Agric. Res.*, v. 34, n. 2, p. 185-191, 1991.

WEIR, T. L.; PARK, S.W; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**. V.7, p.472-479, 2004.

ZAYNAB, M. et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, 2018.

ZOBEL, A., NIGHSWANDER, J. E. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles due to salt spray. **Annals of Botany**, 66(6), 629-640, 1990.

TABELAS

Tabela 1- Classes de metabólitos secundários detectados na análise fitoquímica qualitativa do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* (EABO).

CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	DETECÇÃO
Compostos fenólicos	+++
Triterpenóides	++
Esteróides	ND
Flavonóides	+++
Catequinas	ND
Taninos	ND
Flavonas	ND
Leucoantocianidinas	ND
Antocianidinas	ND
Chalconas	ND
Alcalóides	++
Saponinas	+++
Antraquinonas	ND
Cumarinas	+++

Legenda: (+++) forte; (++) moderado; (+) fraco; (ND) não detectado.

Tabela 2. Características físicas e químicas do EABO.

EABO (0,1 g MF.mL ⁻¹)	pH	CE (dS.m ⁻¹)	Ψ _o (MPa)
0%	5,78 ± 0,1871a	4,053±0,2311e	-0,0014 ±0,0007a
25%	4,52 ± 0,010b	442 ±15,6815b	-0,1591 ±0,0056b
50%	4,44 ± 0,005b	721,9 ±25,4837c	-0,2598 ±0,0091c
75%	4,38 ± 0,011b	1050 ±5,5677d	-0,3780 ±0,0020d
100%	4,45 ± 0,005b	1602,7 ±19,3993a	-0,5769 ±0,0069e
CV(%)	1,78	2,11	-2,11

Valores expressos em M±DP. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa entre os tratamentos (p<0,5). Dados obtidos a partir de três leituras para cada parâmetro analisado (n=3).

Tabela 3. Parâmetros avaliados na germinação e desenvolvimento das plântulas de *Lactuca sativa* L. sob influência de diferentes concentrações do EABO após sete dias.

EABO	IVG	VIGOR	IT
0%	18,93 ± 0,62a	697,4 ± 64,70a	0,995 ± 0,077a
25%	18,51 ± 0,86a	458,8 ± 40,85b	0,768 ± 0,045b
50%	9,67 ± 0,54b	370,2 ± 9,21b	0,797 ± 0,042b
75%	6,50 ± 0,48c	300,7 ± 38,66b	0,717 ± 0,065b
100%	6,40 ± 0,42c	281,6 ± 32,31b	0,625 ± 0,153b

M±EPM Valores seguidos de letras diferentes em cada coluna representam médias que diferem entre si significativamente para p < 0,05 (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey), IVG= Índice de velocidade de germinação; IT= Índice de tolerância ao extrato aquoso de *Bixa orellana*.

Tabela 4. Teor de pigmentos fotossintetizantes em plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas a diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *Bixa orellana* L. (EABO).

TRATAMENTOS	<i>Pigmentos Fotossintéticos (μg.gMF⁻¹)</i>			
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenoides
0%	425,97 ±45,46a	127,62 ±17,15a	553,60 ±62,50a	113,12 ±10,76a
25%	504,21 ±33,01a	115,82 ±57,03a	620,03 ±40,36a	138,36 ±8,62b
50%	415,35 ±29,20a	122,32 ±10,56a	537,67 ±39,77a	114,68 ±5,31a
75%	299,33 ±32,12b	84,14 ±11,96a	383,57 ±44,05b	85,39 ±5,81c
100%	311,82 ±52,80b	87,66 ±22,23a	399,48 ±73,69b	84,90 ±11,85c
CV (%)	31,48	19,20	21,12	20,02

Valores expressos por média ± erro padrão da média. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey p<0,05.

FIGURAS

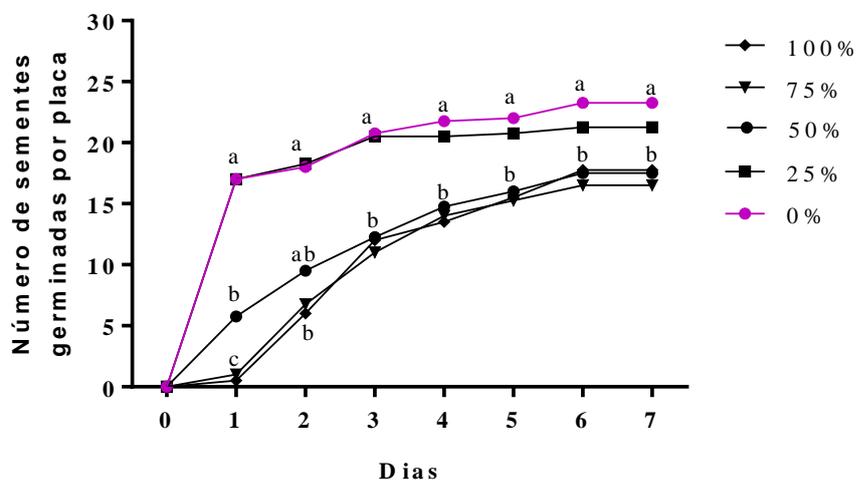


Figura 1. Comportamento da germinação de sementes de *L. sativa* expostas a concentrações do extrato aquoso de folhas de *B. orellana* L. (EABO) durante sete dias, em relação ao grupo controle (0%). Letras diferentes representam médias que diferem entre si significativamente para $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias, Teste de Tukey).

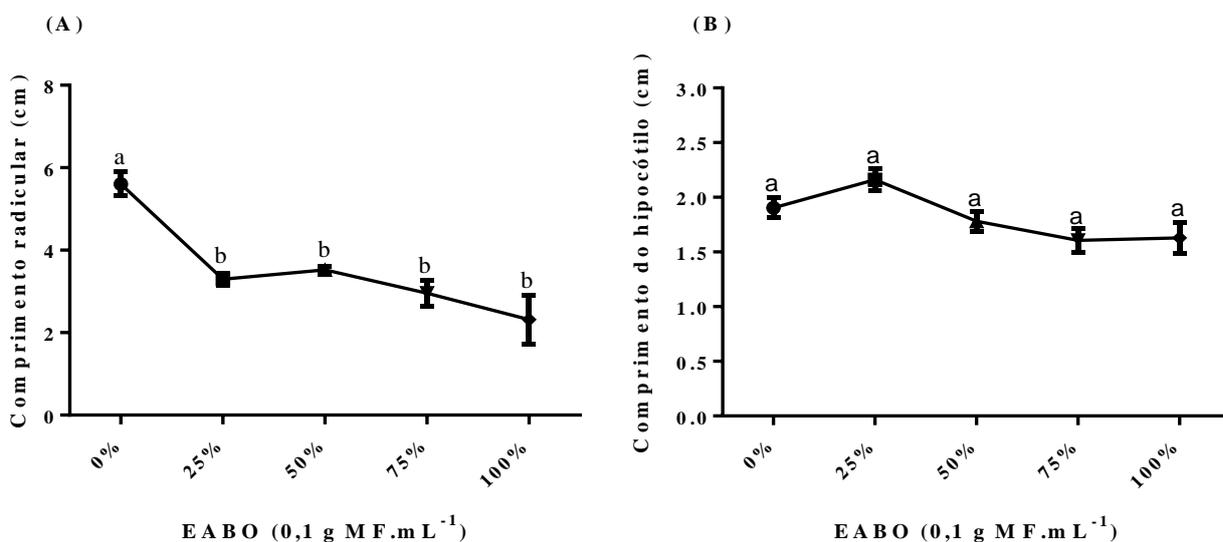


Figura 2: Efeito do extrato aquoso de folhas de *Bixa orellana* L. sobre o comprimento radicular (A) e hipocótilo (B) de plântulas de *Lactuca sativa* L. Letras diferentes representam valores médios que diferem significativamente entre si para $p < 0,05$.

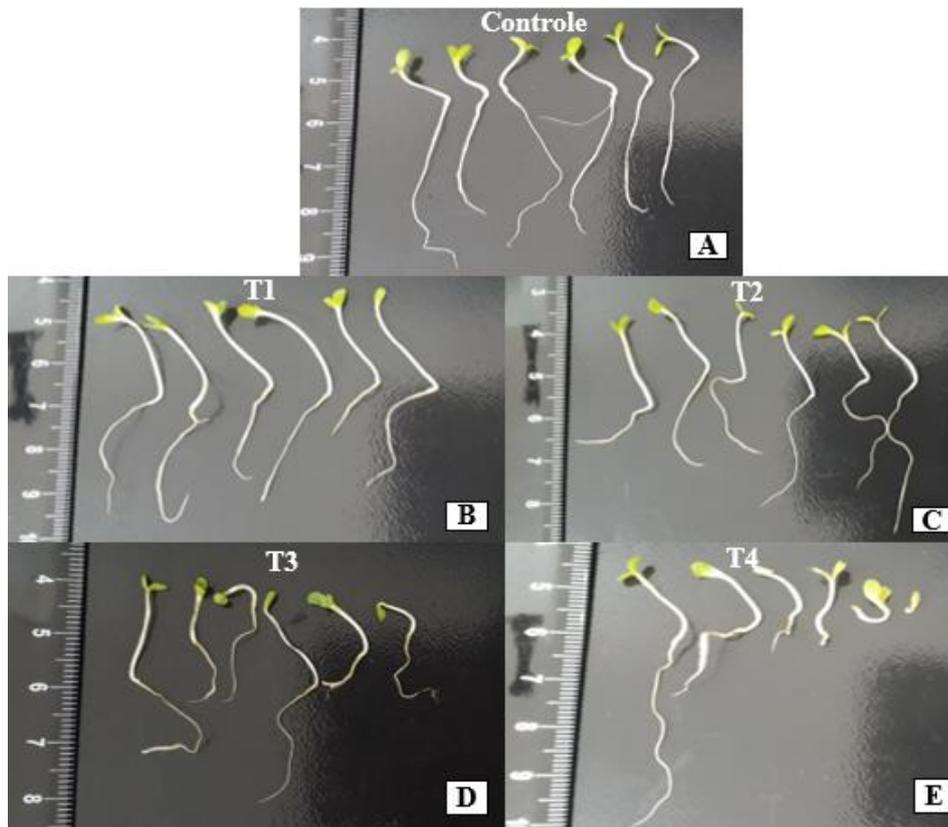


Figura 3. Plântulas de *Lactuca sativa* L. obtidas após sete dias de germinação na presença de água destilada ou diferentes concentrações de EABO, indicando sua influência no comprimento da radícula para os tratamentos (B) 25%; (C) 50%, (D) 75% e (E) 100% em relação ao tratamento controle (A) 0%. As plântulas mostradas são representativas de 4 repetições (6 réplicas cada).

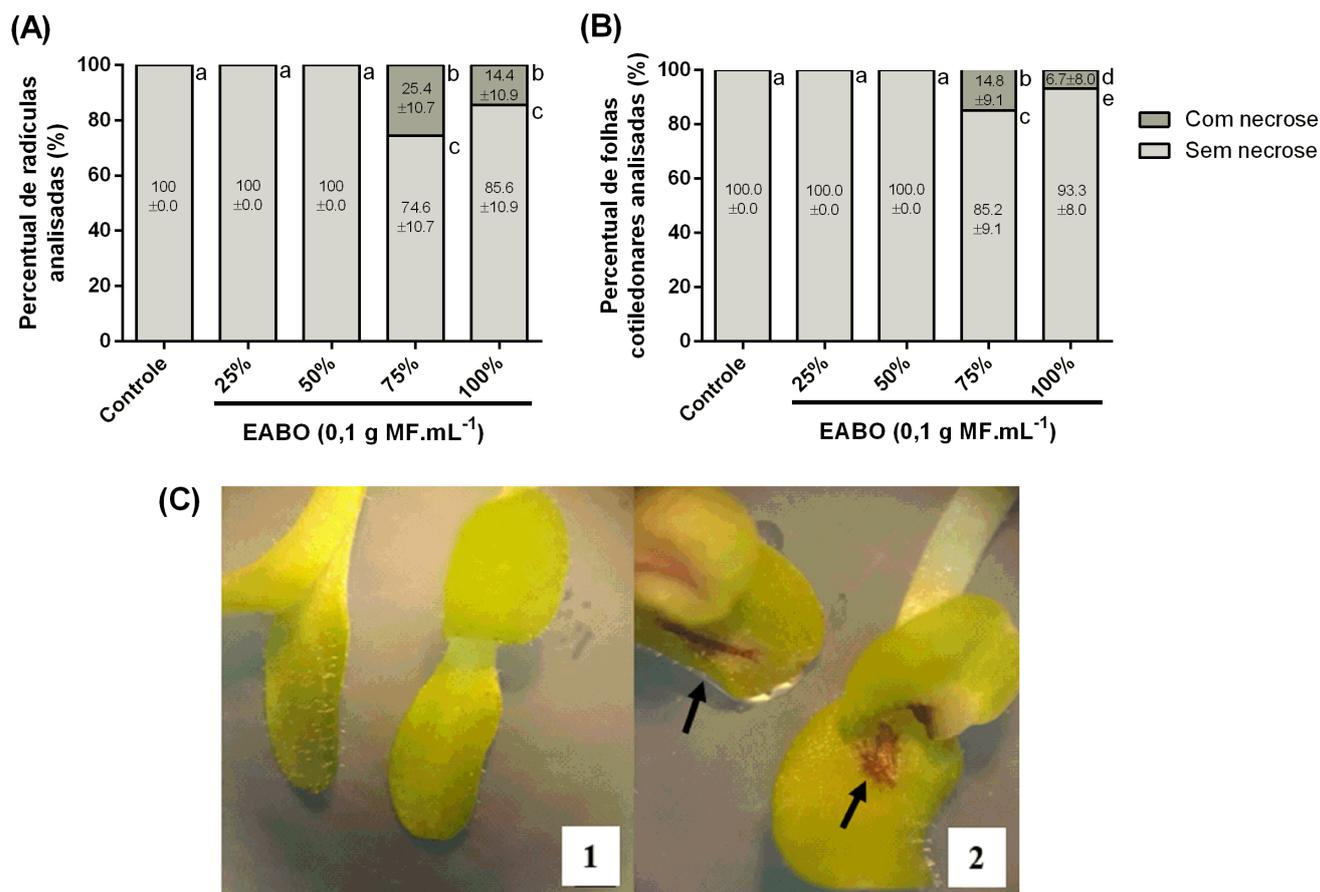


Figura 4: Percentual de plântulas de *Lactuca sativa* com necrose em diferentes estruturas, tratadas com EABO. (A) Gráfico com percentual de plântulas com radículas analisadas com necrose; (B) Percentual de plântulas com folhas cotiledonares analisadas com necrose. (C) Observação em lupa estereoscópica de folhas cotiledonares de plântulas de *Lactuca sativa* L. (aumento de 40x). (1) Folhas cotiledonares de plântulas representativas do grupo controle (tratamento água destilada, 0% EABO); (2) Folhas primárias de plântulas representativas do grupo EABO (0,1 g MF.mL⁻¹) nas concentrações 75% (esquerda) e 100% (direita). As setas indicam a presença de necrose foliar. Letras diferentes representam médias que diferem entre si significativamente para $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn).

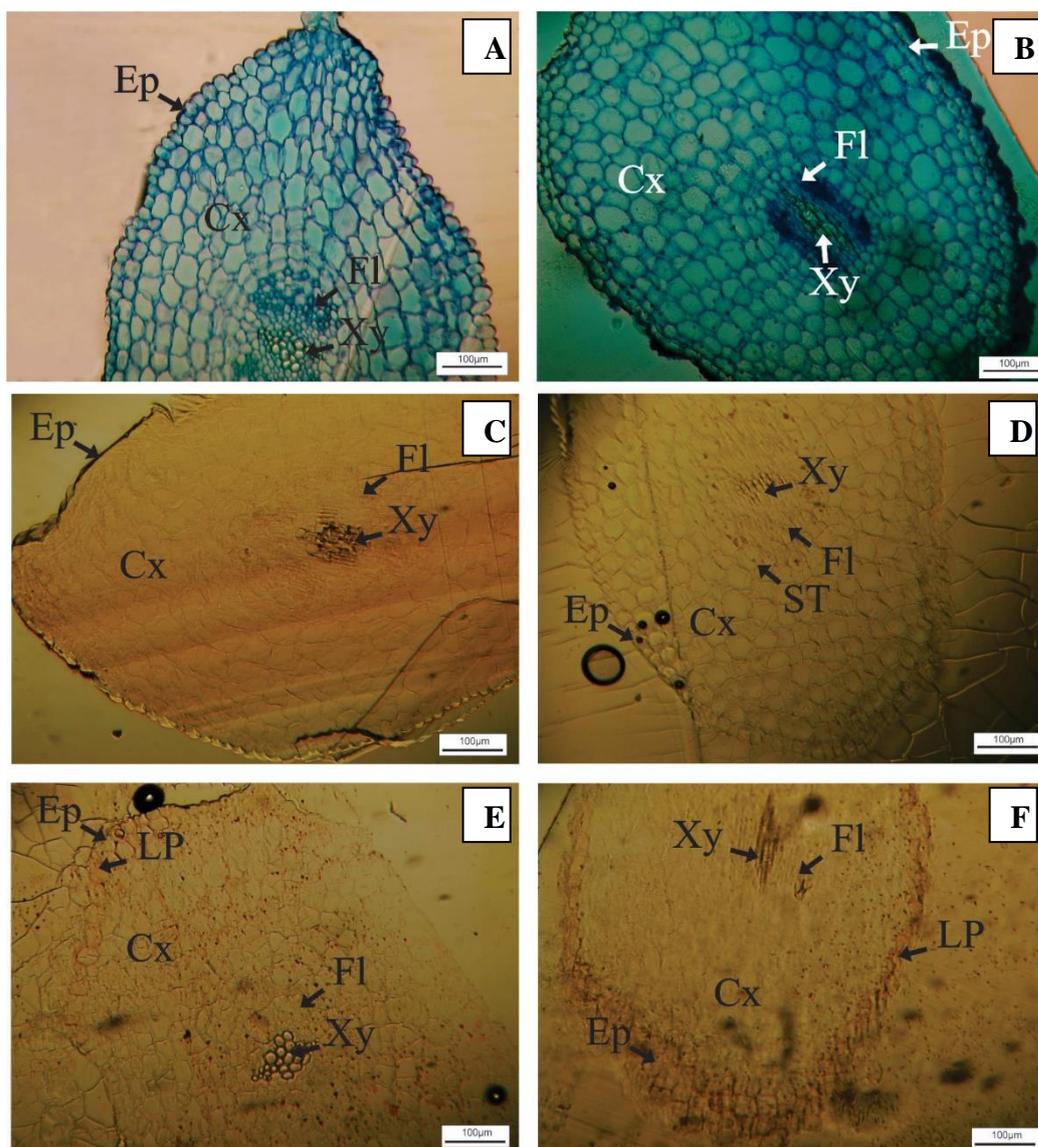


Figura 5: Observação em microscópio óptico de cortes anatômicos transversais da radícula de *L. Sativa* L. sobre influência do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) (aumento 10x). Imagens A, C e E representam o controle; imagens B, D e F representam o tratamento de maior concentração (100%). (A) e (B) representam a forma estrutural das células coradas com Azul de Toluidina; (C) e (D) coradas com Lugol indicam a presença de amido (ST); (E) e [100%] (F) coradas com Sudan III indicam a presença de lipídeos (LP). Ep= epiderme; Cx= córtex; Fl= floema; Xy= xilema.

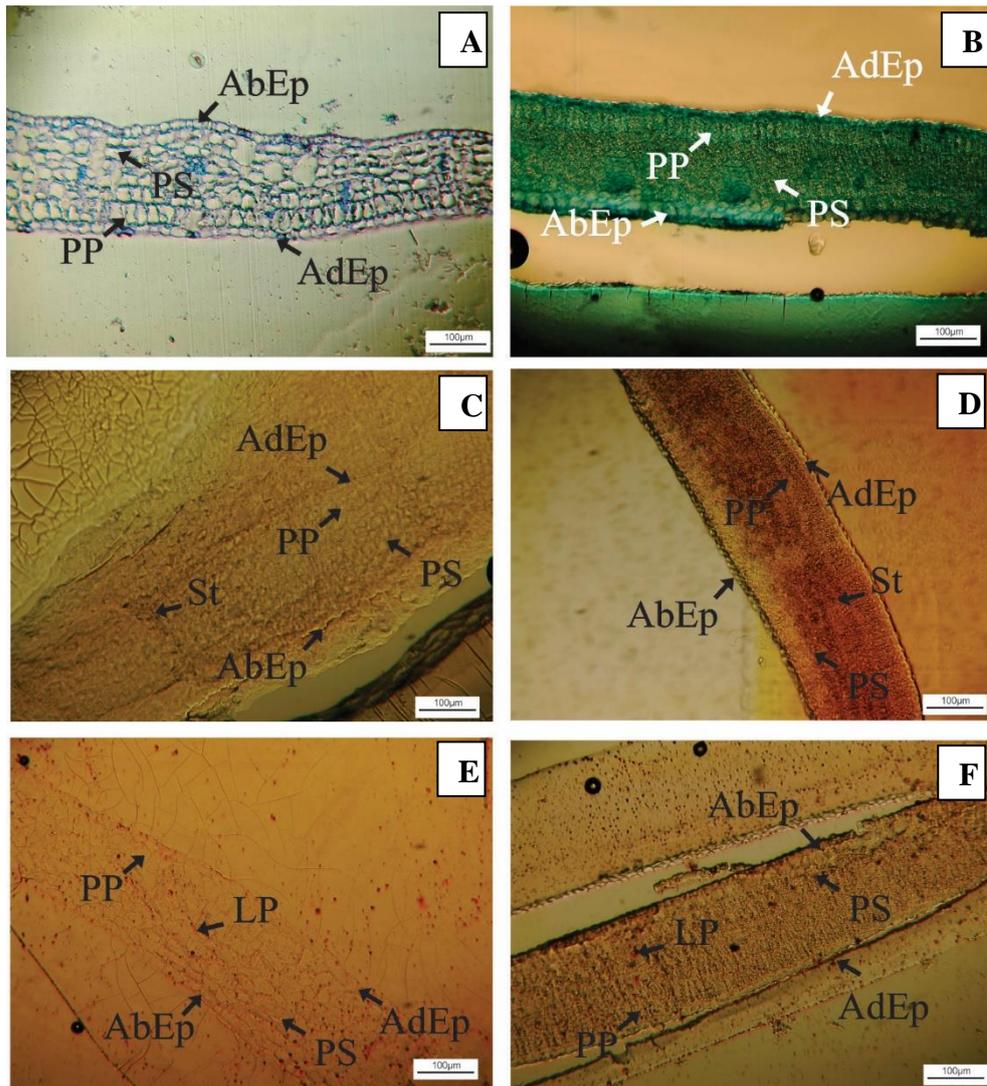


Figura 6: Observação em microscópio óptico de cortes anatômicos transversais das folhas cotiledonares de *L. Sativa* L. sobre influência do extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. (EABO) (aumento 10x). Imagens A, C e E representam o controle; imagens B, D e F representam o tratamento de maior concentração (100%). (A) e (B) representam a forma estrutural das células coradas com Azul de Toluidina; (C) e (D) coradas com Lugol indicam a presença de amido (ST); (E) e (F) coradas com Sudan III indicam a presença de lipídeos (LP). AbEp= epiderme abaxial; AdEp= epiderme adaxial; PP= parênquima paliçádico; LP= lipídeos; PS= parênquima esponjoso.