

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**VIABILIDADE POLÍNICA, GENOTOXICIDADE,  
EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E COMPOSTOS  
FENÓLICOS DE *Peltodon longipes* KUNTH EX BENTH.  
(LAMIACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Andrielle Wouters Kuhn**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**VIABILIDADE POLÍNICA, GENOTOXICIDADE, EFEITO  
ANTIPROLIFERATIVO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
*Peltodon longipes* KUNTH EX BENTH. (LAMIACEAE)**

**Andrielle Wouters Kuhn**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Solange Bosio Tedesco**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Wouters Kuhn, Andrielle  
VIABILIDADE POLÍNICA, GENOTOXICIDADE, EFEITO  
ANTIPROLIFERATIVO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Peltodon*  
*longipes* KUNTH EX BENTH. (LAMIACEAE) / Andrielle Wouters  
Kuhn.-2015.  
56 f.; 30cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2015

1. *Peltodon longipes* 2. Viabilidade polínica 3. Teste  
de *Allium cepa* 4. Compostos fenólicos 5. Efeito  
antiproliferativo I. Bosio Tedesco, Solange II. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da  
Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

---

© 2015

Todos os direitos reservados a Andrielle Wouters Kuhn. A reprodução de partes ou  
do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Barão do Triunfo, 459/102, Nossa Senhora do Rosário, Santa Maria – RS.  
CEP: 97010-070.

E-mail: andri-kuhn@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**VIABILIDADE POLÍNICA, GENOTOXICIDADE, EFEITO  
ANTIPROLIFERATIVO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
*Peltodon longipes* KUNTH EX BENTH. (LAMIACEAE)**

Elaborada por  
**Andrielle Wouters Kuhn**

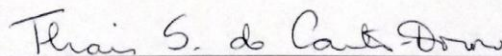
Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**Comissão Examinadora**



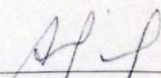
---

**Solange Bosio Tedesco, Dr<sup>a</sup>**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Thais Scotti do Canto-Dorow, Dr<sup>a</sup>** (Unifra)



---

**Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr** (UFSM)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico aos meus pais,  
por serem parte preciosa na realização desse sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, obrigada por ser sustentação e cuidado a cada dia.

À minha família, pai, mãe, mano, mana, sobrinhos e vó (*in memorian*). Por serem apoio, amor e carinho, fazendo a vida sempre mais feliz.

À professora e orientadora Solange, fundamental na minha trajetória acadêmica, sendo norteadora e incentivadora. Obrigada pela amizade e confiança.

À professora Thais, pelo auxílio durante a coleta das plantas e por todo aprendizado durante os momentos de trabalho.

Aos demais professores do PPGAgrobio, por serem fonte de conhecimento e inspiração.

À FAPERGS/CAPES, que me permitiu dedicação exclusiva a esse trabalho.

Aos amigos de perto e de longe, que fizeram dessa época, mesmo em meio a correria, um tempo de alegrias.

À Marília, pela amizade sincera, sendo presença confirmada no dia a dia e minha “célula companheira”.

Aos colegas do LABCITOGEN, por serem a companhia e o divertimento de todos os dias, em especial à Vivi, pela amizade e ajuda durante todo esse tempo.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **VIABILIDADE POLÍNICA, GENOTOXICIDADE, EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Peltodon longipes* KUNTH EX BENTH. (LAMIACEAE)**

AUTORA: ANDRIELLE WOUTERS KUHN  
ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SOLANGE BOSIO TEDESCO  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

O Brasil possui um imenso potencial econômico relacionado a espécies medicinais nativas, por isso é de extrema importância a conservação da diversidade genética vegetal disponível. No entanto, a grande maioria dessas espécies não foi suficientemente estudada no que se refere ao seu potencial citotóxico e mutagênico. Dentre as plantas medicinais nativas do Brasil, ainda pouco estudadas, está *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (hortelã-do-campo) utilizada como estimulante, emenagoga, antiséptica e antiinflamatória. Para potencializar a utilização dos recursos medicinais nativos de um país são indispensáveis estudos de caracterização do germoplasma das espécies e também propiciar que as mesmas sejam incluídas em um programa de melhoramento genético, além de otimizar o uso na medicina popular através de estudos de citotoxicidade e genotoxicidade. Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi estimar a viabilidade polínica de *P. longipes*, avaliar a genotoxicidade dos extratos aquosos da espécie, bem como determinar os compostos fenólicos desses extratos por meio de análise cromatográfica. Para tanto, a viabilidade polínica de 15 acessos de *P. longipes*, coletados em cinco municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, foi estimada a partir de três métodos colorímetros: orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. A genotoxicidade dos extratos aquosos de dois acessos, um de Santa Maria e outro de Tupanciretã (RS), foi determinada através do teste de *Allium cepa* L., enquanto a análise dos compostos fenólicos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Dos 15 acessos de *P. longipes*, 13 apresentaram alta viabilidade polínica, com valores acima de 75% e os métodos utilizando carmim acético 2% e reativo de Alexander foram mais eficientes para a técnica na espécie. Todos os extratos de *P. longipes* demonstraram potencial antiproliferativo, embora o efeito tenha sido significativamente maior nos extratos do acesso de Tupanciretã. Esse acesso também apresentou maior quantidade de ácido rosmarínico e canferol, o que pode estar relacionado com os efeitos observados nesses extratos. Somente os extratos do acesso de Santa Maria demonstraram potencial genotóxico.

**Palavras-chave:** Grão de pólen. Teste de *Allium cepa*. Efeito antiproliferativo. Cromatografia.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **POLLEN VIABILITY, GENOTOXICITY, ANTIPROLIFERATIVE EFFECT AND PHENOLIC COMPOUNDS OF *Peltodon longipes* KUNTH EX BENTH. (LAMIACEAE)**

AUTHOR: ANDRIELLE WOUTERS KUHN  
ADVISER: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SOLANGE BOSIO TEDESCO  
Defense Place and Date: Santa Maria, february 27<sup>th</sup>, 2015.

Brazil has got a great economic potential with regard to native medicinal species. The conservation of the plant genetic diversity available is, therefore, of paramount importance. However, the greater part of these species has not been sufficiently studied, mainly in terms of their cytotoxic and mutagenic potential. Among the Brazilian native medicinal plants that have been little studied is *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. – a plant popularly known in Brazil as ‘hortelã-do-campo’, which is used as stimulant, emmenagogue, antiseptic and anti-inflammatory. To encourage the use of native medicinal resources of a country are necessary studies of characterization of germplasm of species and also provide that they are included in a breeding program, while optimizing the use in folk medicine through cytotoxicity and genotoxicity studies. Thus, the purpose of this study was to estimate the pollen viability of *P. longipes*, to evaluate the genotoxicity of the aqueous extracts of this species as well to determine phenolic compounds these extracts using chromatographic analysis. The pollen viability of 15 *P. longipes* accessions collected in 5 municipalities in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, was evaluated by using 3 staining methods: 2% acetic orcein, 2% acetic carmine, and Alexander’s stain. The genotoxicity of the aqueous extracts of two accessions, i.e., one collected in Santa Maria and the other one in Tupanciretã, was determined by the *Allium cepa* L. test, whereas the analysis of the phenolic compounds was carried out by high-performance liquid chromatography. Of the 15 accessions of *P. longipes*, 13 showed high pollen viability, with values above 75% and the methods using 2% acetic carmine and Alexander reactive were more efficient for technical in species. All extracts presented antiproliferative potential, even though this effect was significantly higher in the extracts of the accession collected in Tupanciretã. This accession also showed a higher amount of rosmarinic acid and kaempferol, which may be linked to the effects observed in these extracts. Only the extracts of the accession collected in Santa Maria showed genotoxic potential.

**Key-words:** Pollen grain. *Allium cepa* test. Antiproliferative effect. Chromatography.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- *Peltodon longipes* (Lamiaceae). A) acesso em beira de estrada no município de Rosário do Sul, RS; B) folhas da espécie em beira de estrada no município de Santa Maria, RS; C) vista geral do xilopódio; D) vista geral do material-testemunho (herbário SMDB/UFSM)..... 13
- Figura 2- Inflorescência de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (Lamiaceae)..... 14

### ARTIGO 1

- Figura 1- Grãos de pólen de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. A) grão de pólen viável corado com orceína acética 2%; B) grão de pólen inviável corado com orceína acética 2%; C) grão de pólen viável corado com carmin acético 2%; D) grão de pólen inviável corado com carmin acético 2%; E) grão de pólen viável corado com reativo de Alexander; F) grão de pólen inviável corado com reativo de Alexander. Escala representa 10µm..... 27

### ARTIGO 2

- Figura 1- Alterações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A) seta indicando micronúcleo em intérfase; B) seta indicando quebra cromossômica em metáfase; C) seta indicando ponte cromossômica em anáfase. Escala representa 10µm. .... 41
- Figura 2- Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência de dois acessos de *Peltodon longipes* (Santa Maria e Tupanciretã). Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), ácido rosmarínico (pico 5), quercitina (pico 6) e canferol (pico 7)..... 42

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1- Acessos de <i>Peltodon longipes</i> Kunth ex Benth. depositados no Herbário SMDB-UFSM como material-testemunho.....	23
Tabela 2- Médias de grãos de pólen viáveis e da viabilidade polínica dos acessos de <i>Peltodon longipes</i> Kunth ex Benth. para os três métodos colorímetros utilizados (SM = Santa Maria; TP = Tupanciretã; SPS = São Pedro do Sul; SVS = São Vicente do Sul; RDS = Rosário do Sul; OA = Orceína acética 2%; CA = Carmim acético 2%; RA = Reativo de Alexander).....	25

### ARTIGO 2

Tabela I- Número total de células, células em intérfase, células em divisão e índice mitótico (IM%) observados no teste de genotoxicidade de dois acessos de <i>Peltodon longipes</i> Kunth ex Benth. (SM = Santa Maria; TP = Tupanciretã; Rec. = Recuperação).....	39
Tabela II- Porcentagem de alterações cromossômicas encontradas em 4000 células analisadas por tratamento no teste de genotoxicidade de dois acessos de <i>Peltodon longipes</i> Kunth ex Benth. (SM= Santa Maria; TP= Tupanciretã; Rec.= Recuperação; MN= Micronúcleo em intérfase; Q= Quebra cromossômica; P= Ponte cromossômica).....	40
Tabela III- Ácidos fenólicos e flavonóides dos extratos de <i>Peltodon longipes</i> Kunth ex Benth. (SM = acesso de Santa Maria; TP = acesso de Tupanciretã; LOD = Limite de detecção; LOQ = Limite de quantificação) .....	43

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>Família Lamiaceae</b> .....	<b>12</b>
<b>Gênero <i>Peltodon</i></b> .....	<b>12</b>
<b><i>Peltodon longipes</i></b> .....	<b>13</b>
<b>Caracterização da viabilidade polínica</b> .....	<b>14</b>
<b>Análise genotóxica através do teste de <i>Allium cepa</i></b> .....	<b>16</b>
<b>Determinação de compostos fenólicos por análise cromatográfica</b> .....	<b>17</b>
<b>ARTIGO 1: VIABILIDADE POLÍNICA DE ACESSOS DE <i>Peltodon longipes</i> KUNTH EX BENTH. ATRAVÉS DE DISTINTOS MÉTODOS COLORÍMETROS</b> .....	<b>19</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>19</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>20</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>21</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>22</b>
<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>24</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>28</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>28</b>
<b>Referências</b> .....	<b>29</b>
<b>ARTIGO 2: ANÁLISES GENOTÓXICA E CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DE <i>Peltodon longipes</i> KUNTH EX BENTH. (HORTELÃ-DO-CAMPO)</b> .....	<b>32</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>32</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>33</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>33</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>35</b>
<b>Análise genotóxica pelo teste de <i>Allium cepa</i></b> .....	<b>35</b>
<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)</b> .....	<b>36</b>
<b>Análise estatística</b> .....	<b>38</b>
<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>38</b>
<b>Análise genotóxica pelo teste de <i>Allium cepa</i></b> .....	<b>38</b>
<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)</b> .....	<b>42</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>44</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>44</b>
<b>Referências</b> .....	<b>45</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>

## INTRODUÇÃO

Pesquisas envolvendo a flora mundial são uma necessidade devido à ampla diversidade de espécies ainda pouco estudadas e constantemente ameaçadas pela ação humana (DONOGHUE; ALVERSON, 2000). Há uma imensa necessidade de conservação dos recursos genéticos disponíveis no Brasil, dentre eles as plantas medicinais nativas do país, que são consideradas uma riqueza a ser preservada pelo seu potencial econômico e etnobotânico. São indispensáveis os estudos de caracterização do germoplasma dessas espécies para aprimorar sua utilização e propiciar que sejam incluídas em programas de melhoramento genético (PEREIRA et al., 2006), além de otimizar o seu uso na medicina popular, através de estudos de citotoxicidade e genotoxicidade.

Os esforços realizados para determinar princípios ativos e mecanismos patogênicos das plantas utilizadas popularmente ainda são reduzidos, já que grande parte dos estudos limitam-se à identificação das espécies e à determinação dos sinais clínicos da patologia e aspectos das intoxicações (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Sendo assim, a maioria dessas plantas, apesar de serem usadas mundialmente no tratamento de doenças, não foram suficientemente estudadas no que diz respeito ao seu potencial citotóxico e mutagênico (BAGATINI et al., 2007) e, por consequência, seu uso, sem o devido controle, pode ser prejudicial à saúde humana (PEREIRA et al., 2006).

Estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem para a utilização segura e eficaz das plantas medicinais. Dentre os diversos testes que possibilitam esse tipo de análise destaca-se o sistema teste vegetal *in vivo* de *Allium cepa* L. (cebola), validado por pesquisadores como Rank e Nielsen (1994), que mostraram uma maior sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação aos testes de Ames e *Microscreen*, além da correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores. Também Vicentini et al. (2001) e Teixeira et al. (2003), que realizaram o teste de forma conjunta com teste animal *in vitro*, obtiveram resultados similares entre eles.

Ainda que o metabolismo vegetal seja diferente, o teste de *A. cepa* é um excelente modelo de análise citotóxica (FISKESJÖ, 1994), permitindo observar a ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular da cebola e, dessa forma, atuando como indicativo para prevenir a população sobre o consumo do produto testado (VICENTINI et al., 2001).

É possível que a presença e até a concentração de alguns compostos químicos presentes nas plantas possuam um efeito, inibitório ou estimulatório, sobre o ciclo celular e

por isso, a importância da avaliação do potencial terapêutico e genotóxico dos extratos vegetais e também de alguns de seus constituintes, como flavonóides e ácidos fenólicos isoladamente que, por ventura, teriam grandes possibilidades de serem incluídos em estudos futuros para o desenvolvimento de novos fármacos.

O emprego de técnicas cromatográficas e analíticas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal mostra-se necessário tanto para o conhecimento da composição química, do princípio ativo ou do composto tóxico de uma planta, como também para a determinação de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirva como marcador daquela espécie, para controle qualitativo e quantitativo da droga, propiciando a padronização do material vegetal e uma caracterização completa da planta (DRASARA; MORAVCOVA, 2004; FAMEI et al., 2006; LIU et al., 2007).

Além disso, é relevante ressaltar a questão da perda de substâncias terapêuticas com propriedades valiosas através da grande velocidade de extinção de espécies no Brasil, que poderia acarretar também perda de genes que codificam enzimas com uso potencial no melhoramento genético de plantas e estudos biossintéticos de novos produtos naturais (CAMPOS, 2010). Dessa forma, os estudos ecológicos, reprodutivos e genéticos de espécies vegetais presentes em tais ambientes são de grande importância para possibilitar uma posterior avaliação da probabilidade de persistência das mesmas (SILVA et al., 2008).

Estudos da viabilidade polínica, que visam a estimativa do potencial de reprodução masculina de espécies, também são muito importantes para caracterização de recursos genéticos e para viabilizar os trabalhos de melhoramento genético. Diferentes métodos são utilizados no estudo da viabilidade polínica, dentre eles os métodos colorímetros, que possuem como pontos positivos a rapidez e o baixo custo. Diversos autores, como Frescura et al. (2012) e Piccinini et al. (2012), utilizaram-se dessas metodologias de coloração para o estudo da viabilidade dos grãos de pólen de diferentes espécies e todos observaram, por meio de comparação com outros corantes testados, que o reativo de Alexander tem se mostrado superior na análise desse parâmetro, permitindo uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo estimar a viabilidade polínica da espécie medicinal nativa do Brasil, *Peltodon longipes* Kunth ex Benth., através de distintos métodos colorímetros, bem como avaliar os efeitos genotóxicos e antiproliferativos dos extratos aquosos por meio do teste de *A. cepa* e determinar os compostos fenólicos desses extratos por análise cromatográfica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Família Lamiaceae

A família Lamiaceae é composta por cerca de 224 gêneros e 5600 espécies distribuídas em todo o planeta (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Os membros da família são constituídos por ervas anuais ou perenes, subarbustos ou arbustos e, raramente, são mencionadas como árvores de pequeno porte (BARROSO, 1991), além disso, na família não foram encontradas epífitas, saprófitas ou parasitas (DOMINGUES-VÁZQUEZ et al., 2002). Geralmente, os ramos jovens são tetragonais, sendo as folhas simples, opostas e com o limbo mostrando transições de bordo inteiro, dentado, lobado ou partido. Em alguns gêneros como *Hyptis* Jacq., *Raphiodon* Benth. e *Peltodon* Pohl os epicastros (falsa espiga ou racemo) podem ser mais curtos e densos dando origem a glomérulos capituliformes simples ou complexos. A corola tubulosa, campanulada ou infundibuliforme apresenta o limbo geralmente diferenciado em superior (lábrum) e inferior (labíolo). O androceu é formado de dois a quatro estames epipétalos e o ovário é bicarpelar e sincárpico. O fruto é esquizocarpo que se desfaz em quatro núculas e as sementes sem endosperma ou com endosperma escasso (BARROSO, 1991).

Muitas das espécies de Lamiaceae são cultivadas desde os tempos remotos devido a suas propriedades aromáticas, medicinais e ornamentais e, por isso, é uma família considerada importante do ponto de vista etnobotânico e econômico (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998). Além disso, a família possui grande importância por ser fonte de óleos essenciais aromáticos e por possuir espécies usadas como condimentos na culinária (MENEZES, 1994).

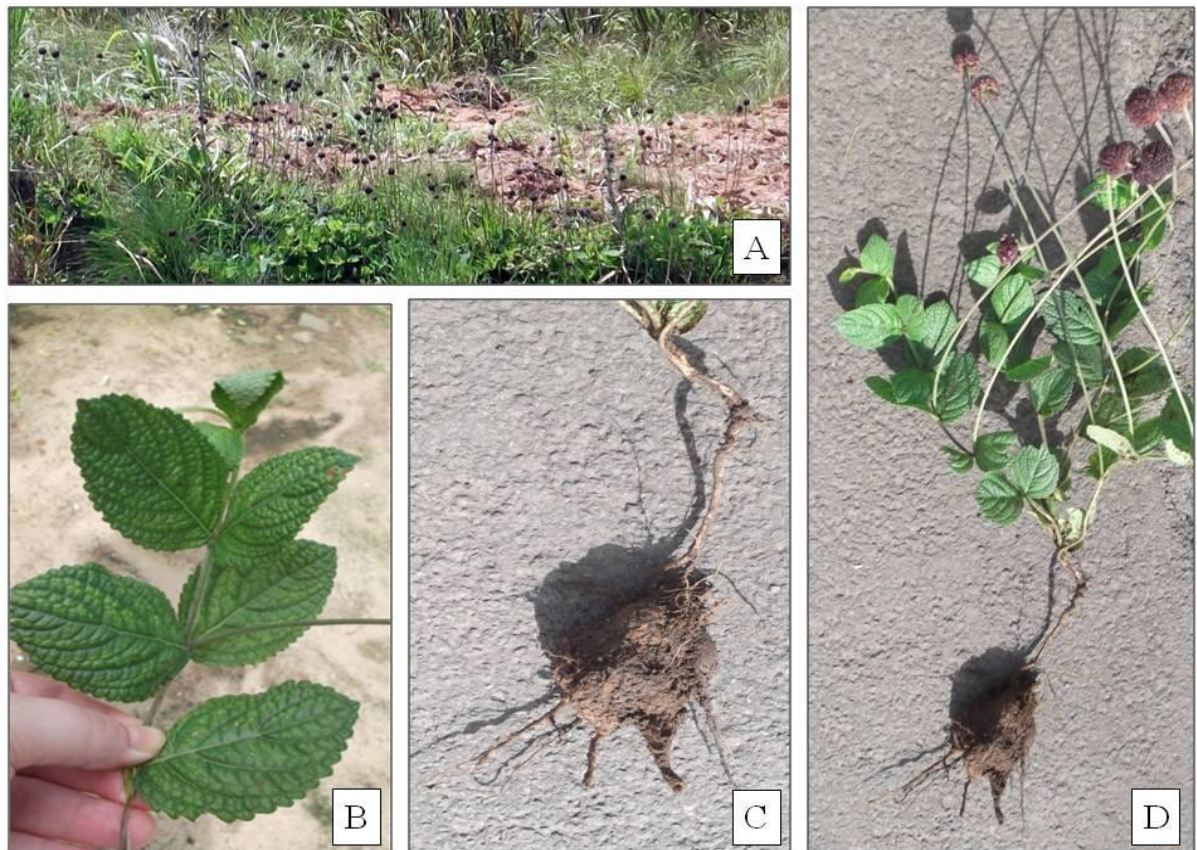
### Gênero *Peltodon*

O gênero *Peltodon*, exclusivamente sul-americano, tem como limite norte de sua ocorrência os estados de Roraima, Mato Grosso, Goiás e Bahia, no Brasil. Possui cinco espécies conhecidas encontradas em nosso país: *P. radicans* Pohl, *P. pusillus* Pohl, *P. tomentosus* Pohl, *P. rugosus* Tolm. e *P. longipes*, sendo esta última a única que ocorre também fora do Brasil, com distribuição de São Paulo até Paraguai e Argentina. O gênero caracteriza-se, principalmente, pela forma peculiar dos dentes do cálice que são peltados, residindo aí a diferença básica para o gênero mais afim – *Hyptis* Jacq. Além disso, com exceção de *P. radicans*, as demais espécies apresentam como característica importante o xilopódio bem desenvolvido (FERREIRA, 1986).

***Peltodon longipes* Kunth ex Benth.**

A espécie *P. longipes* (Figura 1-A) ocorre na região sul, principalmente nos campos de altitude (Planalto Meridional) e é conhecida popularmente pelos nomes de hortelã-do-campo, santa-maria e alfavaca-de-cheiro (LORENZI; MATOS, 2008) ou ainda como hortelã-do-mato ou saudade-do-campo (FERREIRA, 1986), possuindo como sinônimo *P. comaroides* Briq. (BRIQUET, 1889).

Tratam-se de plantas com xilopódio (Figura 1-C), de ramos lenhosos procumbentes, tenuemente estriados, de 7,8 – 46,9cm de comprimento, pubescentes. Suas folhas (Figur 1-B) são decussadas, sésseis a sub-sésseis, coriáceas, com 2,2 – 9,2cm de comprimento e 1,6 – 7,1cm de largura, ovado-arredondadas, de ápice agudo, base arredondada, superiormente bulado-rugosas, com pelos esparsos, inferiormente com pelos apenas sobre as nervuras e, as inflorescências (Figura 2), são longamente pedunculadas (Figura 1-D) (FERREIRA, 1986).



**Figura 1-** *Peltodon longipes* (Lamiaceae). A) acesso em beira de estrada no município de Rosário do Sul, RS; B) folhas da espécie em beira de estrada no município de Santa Maria, RS; C) vista geral do xilopódio; D) vista geral do material-testemunho (herbário SMDB/UFSM).



**Figura 2** – Inflorescência de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (Lamiaceae).

A espécie *P. longipes* é utilizada na medicina popular como estimulante e emenagoga (regulando e induzindo a menstruação normal) (MORS et al., 2000), e suas raízes são usadas como antiséptico e antiinflamatório (FRONZA et al., 2011). Um estudo químico com essa planta mostrou que seus tecidos apresentam ácido ursólico (ZELNIK et al., 1978/79). Além disso, em um estudo realizado por Fronza et al. (2012), cinco diterpenos, 7 alfa-acetoxyroyleanone, horminone, royleanone, 7-ketoroyleanone e sugiol foram previamente isolados de *P. longipes* e demonstraram possuir atividade citotóxica contra um tipo de células de câncer pancreático humano.

Quanto à estudos envolvendo a viabilidade polínica da espécie e trabalhos relacionados à detecção dos efeitos dos extratos de *P. longipes*, não foram encontradas referências na literatura.

### **Caracterização da viabilidade polínica**

A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas, permitindo evidenciar a potencialidade reprodutora masculina, o que contribui para o planejamento do melhoramento genético (SOUZA et al., 2004), além de auxiliar em estudos



taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética (ALEXANDER, 1980). A fertilidade de uma espécie é consequência da formação de gametas normais e balanceados (MARTINS et al., 2010) e pode ser medida por meio de germinação *in vitro* (PIO et al. 2007) ou *in vivo* (FERREIRA et al., 2007), ou ainda através de métodos colorímetros (MUNHOZ et a., 2008).

Existem diferentes metodologias de coloração que estimam a viabilidade polínica, como os corantes orceína acética, o carmim acético e o reativo de Alexander. A orceína acética, segundo Paula (2009), cora o material genético dos polens em vermelho, sendo realizada a distinção entre viáveis e inviáveis pela intensidade da cor, o que poderia causar uma superestimação da viabilidade polínica. O carmim acético também cora em vermelho o material genético dos polens, porém apenas os grãos viáveis mostram-se vermelhos, enquanto os grãos inviáveis são transparentes ou não corados (PAGLIARINI; POZZOBON, 2004). Já, o reativo de Alexander, permite a distinção entre polens viáveis e inviáveis corando de forma diferenciada a celulose da parede do grão de pólen, em verde-claro-azulado, e o protoplasma, em púrpura, facilitando a distinção (ALEXANDER, 1980).

Estudos de viabilidade polínica não foram encontrados para *Peltodon*, no entanto espécies de outros gêneros da família Lamiaceae já foram submetidas à estimativa da viabilidade polínica. Almeida et al. (2006), realizaram a comparação entre os corantes carmim acético, orceína acética, azul-de-amã e lugol na estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de *Ocimum selloi* Benth. e *O. officinalis* L., observando que não houve diferença significativa entre os corantes para *O. selloi* e considerando o carmim acético como o corante mais eficiente para a espécie *O. officinalis*. *O. canum* Sims, de acordo com Silva et al. (2008), apresentou elevadas taxas de viabilidade polínica na pré-antese, antese e pós-antese, apesar de ter sido observada uma diminuição na viabilidade dos grãos de pólen na antese, período no qual as temperaturas foram mais elevadas. E, para *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., os valores variaram de 83,25 a 96% entre as populações estudadas (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Além de espécies da família Lamiaceae, outras espécies também tem sido estudadas no que se refere à viabilidade polínica. Frescura et al. (2012) estimaram a viabilidade polínica de *Polygala paniculata* L. (barba-de-bode), através do uso de três corantes distintos, a orceína acética 2%, o carmim acético 2% e o reativo de Alexander, e foi observada uma alta viabilidade para a maioria das populações estudadas e verificado que o reativo de Alexander foi o corante mais eficiente para a técnica nessa espécie. Na estimativa da viabilidade polínica do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees.), Piccinini et al. (2012) também observaram alta viabilidade para todos os genótipos estudados e registraram maior eficácia na distinção de

grãos de pólen viáveis e inviáveis com o uso do reativo de Alexander. Também foi realizada a estimativa para duas espécies de ipês, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (sob *Tabebuia impetiginosa*) e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (sob *Tabebuia chrysotricha*), através de cinco métodos colorímetros distintos, sendo encontrada uma alta taxa de viabilidade média geral para ambas as espécies e dados semelhantes para os corantes orceína acética, carmim acético e lugol (ARENAS-DE-SOUZA et al., 2014). E Cuchiara et al. (2008) encontraram uma alta viabilidade polínica para distintos genótipos de mamoneira (*Ricinus communis* L.), através do uso de três corantes, *Trypan Blue*, carmim acético 2% e reativo de Alexander.

### **Análise da genotoxicidade através do teste de *Allium cepa***

O sistema teste de *A. cepa* foi criado por Levan (1938) e consiste em colocar os bulbos de cebola para enraizar em água destilada e, posteriormente, deixá-los em contato direto com a substância a ser testada durante 24 horas. Desde a sua criação, o teste sofreu adaptações na metodologia para permitir uma análise mais abrangente de produtos químicos, misturas complexas e substâncias puras. Em 1985, os primeiros ajustes foram realizados por Fiskesjö para a utilização do teste no monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas. Além disso, Fiskesjö (1985) demonstrou a relevância do sistema teste para a avaliação da genotoxicidade de hidrocarbonetos policíclicos, pois as células de *A. cepa* apresentam um sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos, apesar de outros sistemas teste se mostrarem também sensíveis para essa detecção.

No Brasil, o uso de extratos vegetais, infusões ou emplastos no tratamento de doenças é uma prática comum (VEIGA-JUNIOR, 2008). No entanto, estudos relativos às propriedades tóxicas e mutagênicas de plantas medicinais são necessários para verificar a eficácia e segurança da sua utilização no tratamento de algumas doenças (FERREIRA et al, 2009). Neste contexto, as células meristemáticas de *A. cepa* são muito utilizadas como um sistema de ensaio vegetal para indicar o potencial genotóxico dos extratos de plantas medicinais (BAGATINI, 2009). O teste é usado na avaliação de danos ao DNA, como aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico (LEME; MARIN-MORALES, 2009), sendo considerado eficiente na análise e acompanhamento *in situ* da genotoxicidade de várias substâncias (SILVA et al., 2004).

Os resultados do teste de *A. cepa* devem ser considerados como um alerta a outros organismos, atuando como um bioindicador, sendo os estudos de sensibilidade e correlação entre os sistemas teste fundamentais para avaliação mais precisa dos riscos ambientais e para extrapolação dos dados a outros grupos de organismos alvo (FISKESJÖ, 1985). Alguns estudos demonstram a sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação a outros testes, incluindo estudos de comparação com células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos, em que obtiveram resultados semelhantes (RANK; NIELSEN, 1994; VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003).

Utilizando-se desse sistema teste vegetal, pesquisadores tem realizado a avaliação da genotoxicidade de diversas plantas. Lubini et al., (2008) analisaram a genotoxicidade de duas espécies de *Psychotria* (*P. leiocarpa* Cham. & Schldl. e *P. myriantha* Müll. Arg.) através do teste e os resultados indicaram que ambas espécies possuem capacidade para inibição da divisão celular e *P. myriantha* possui atividade genotóxica. De acordo com Knoll et al. (2006), *Pterocaulon polystachyum* DC. demonstrou atividade citotóxica. Também a espécie medicinal *Solidago microglossa* DC., a arnica, apresentou atividade antiproliferativa em seus extratos, na concentração de  $14\text{mg.mL}^{-1}$ , (BAGATINI et al., 2009). E, de acordo com Rossato et al. (2010), a infusão de folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera cultivadas em campo, também demonstrou possuir atividade antiproliferativa.

O efeito dos extratos de espécies vegetais, detectado por meio de técnicas como o teste de *A. cepa*, pode ser consequência dos componentes químicos presentes nestas plantas. Para a espécie *P. longipes*, não foram encontrados registros da determinação de seus constituintes químicos por meio de técnicas analíticas e cromatográficas.

### **Determinação de compostos fenólicos por análise cromatográfica**

A determinação da constituição química da amostra pode ser feita por diferentes técnicas cromatográficas, dentre elas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (LIANG et al., 2004). A CLAE é uma técnica de separação e isolamento de substâncias de um extrato vegetal que tornou-se um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, devido à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI et al., 2002).

Além disso, a técnica apresenta-se com relativa facilidade de manipulação e permite ampla análise de diferentes compostos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010), além de ser rápida e possuir alta sensibilidade e seletividade, sendo que o perfil de uma planta traçado pelo uso da CLAE, por exemplo, pode proporcionar a identificação da presença dos marcadores e de outros compostos, oferecendo uma caracterização completa da planta e, também, permitindo a distinção entre espécies próximas (DRASARA; MORAVCOVA, 2004; LIU et al., 2007).

Espécies como *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. e *C. sessiliflora* (O. Berg.) Mattos tiveram seus teores de fenóis e flavonóides analisados e demonstraram que o teor de fenóis foi superior ao teor de flavonóides em todas as análises, sendo que os extratos orgânicos e os infusos das folhas coletadas no período reprodutivo apresentaram teores de fenóis e de flavonóides superiores em ambas as espécies (KATAOKA; CARDOSO, 2013). A avaliação da concentração de compostos fenólicos também foi realizada para extratos de *Rosmarinus officinalis* L., por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjos de Diodo (CLAE-DAD), que revelou a presença de quercetina, rutina e canferol (flavonóides) e ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido rosmarínico e ácido carnósico (ácidos fenólicos), sendo o ácido rosmarínico o composto mais abundante nos extratos (FRESCURA et al., 2013).

Apesar do perfil cromatográfico de algumas plantas já ser conhecido, como as já citadas, a maioria das espécies utilizadas na medicina popular ainda necessita de estudos científicos mais detalhados, incluindo a padronização química (SOUZA-MOREIRA et al., 2010), o que pode ser realizado através de métodos cromatográficos.

## ARTIGO 1

### Viabilidade polínica de acessos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. através de distintos métodos colorímetros

#### RESUMO

A viabilidade polínica evidencia o potencial de reprodução masculina das espécies vegetais, podendo ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos. Visando fornecer informações a respeito da espécie medicinal *Peltodon longipes* Kunth ex Benth., objetivou-se estimar a viabilidade polínica de acessos da espécie do estado do Rio Grande do Sul, através de três métodos colorímetros, além de determinar o corante mais eficiente. As inflorescências de 15 acessos foram coletadas em cinco municípios sul-riograndenses, fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas e, posteriormente, permaneceram em etanol 70% sob refrigeração até a preparação das lâminas pela técnica de esmagamento. Foram utilizados três métodos colorímetros: a orceína acética 2%, o carmim acético 2% e o reativo de Alexander. Para a orceína acética, foram considerados viáveis os grãos de pólen fortemente corados e, inviáveis, os de coloração fraca. Para o carmim acético, foram considerados viáveis os polens corados em vermelho, enquanto os transparentes ou não corados, foram ditos inviáveis. E, para o reativo de Alexander, os grãos de pólen de coloração púrpura foram considerados viáveis e, os grãos de pólen de coloração verde-claro-azulado, inviáveis. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dos 15 acessos de *P. longipes*, 13 apresentaram alta viabilidade polínica, com valores acima de 75% e os métodos usando carmim acético 2% e reativo de Alexander foram os mais eficientes para a técnica na espécie

**Palavras-chave:** Pólen. Coloração. Orceína acética. Carmim acético. Reativo de Alexander.

**ABSTRACT**

The pollen viability evinces the masculine breeding potential in vegetal species, and it may be useful for taxonomic, ecological, genetic and palynological studies. In order to provide information on the medicinal species *Peltodon longipes*, this study aimed at estimating the pollen viability in accessions of this species collected in the state of Rio Grande do Sul, by using three staining methods, as well as determining the most efficient stain. The inflorescences of 15 accessions were collected and fixed in ethanol/acetic acid (3:1 v/v) for 24 hours and, subsequently, placed in 70% (v/v) ethanol under refrigeration until preparation of slides by the squash technique. Three staining methods were used: 2% acetic orcein, 2% acetic carmine, and Alexander's stain. Pollen grains stained with 2% acetic orcein that presented intense coloration were considered viable, while those of weak coloration were considered non-viable. The grains treated with 2% acetic carmine were considered viable when they were colored red, whereas the transparent ones and those showing no staining were considered non-viable. The pollen grains stained with Alexander's stain were viable when the pollen was purple and non-viable when it was light blue-green. A completely randomized design was used and the data collected was submitted to the analysis of variance (ANOVA) and compared by the Scott-Knott test at 5% probability of error. Of the 15 accessions of *P. longipes*, 13 showed high pollen viability, with values above 75% and the methods using 2% acetic carmine and Alexander reactive were more efficient for technical in species.

**Key-words:** Pollen. Staining. Acetic orcein. Carmine acetic. Alexander's stain.

## INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, algumas plantas já eram conhecidas e utilizadas no tratamento de diversas doenças devido a seus poderes medicinais (FEIJÓ et al., 2012). Com o desenvolvimento da ciência, o valor terapêutico das plantas medicinais tem sido investigado e confirmado, crescendo, em razão disso, a recomendação de uso dessas espécies vegetais por profissionais da área da saúde (ARNOUS et al., 2005).

No Brasil, aproximadamente metade das plantas podem apresentar algum tipo de propriedade terapêutica (MARTINS et al., 1994) e, por isso, o país assume extrema responsabilidade na preservação e exploração sustentável dessas espécies, que sofrem com o extrativismo que compromete, algumas vezes, populações inteiras (FACANALI, 2008). Apesar da importância das espécies medicinais, são escassos os estudos sobre elas (MORAES et al., 2002), principalmente no que se refere ao seu sistema reprodutivo (ALMEIDA et al., 2004).

Para que a preservação *in situ* e *ex situ* seja possível, são necessárias informações a respeito da distribuição geográfica das espécies em questão, além de estudos demográficos, fisiológicos, de biologia reprodutiva e diversidade genética, permitindo o manejo sustentável, a domesticação e o cultivo das espécies, reduzindo o impacto do extrativismo predatório (FACANALI, 2008). O conhecimento do sistema de reprodução de uma espécie é importante para a conservação do germoplasma, o manejo em cultivo e para o melhoramento genético, pois permite definir estratégias de seleção com base em cruzamentos intra e interpopulacionais (DANNER et al., 2011).

A estimativa de viabilidade polínica é importante para a análise de fluxo gênico em plantas, uma vez que evidencia o potencial de reprodução masculina da espécie, podendo ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (FRESCURA et al., 2012). Dessa forma, pode-se investigar a possibilidade de variabilidade genética entre populações ou acessos de uma mesma espécie, havendo, nesse caso, variação da viabilidade polínica entre eles.

Essa medida da fertilidade masculina, pode ser determinada por método direto, com uso de técnicas de indução à germinação *in vitro* (PIO et al. 2007) ou *in vivo* (FERREIRA et al. 2007), ou ainda estimada, de forma indireta, baseada em parâmetros citológicos através de diversos métodos colorímetros (MUNHOZ et al. 2008), dentre eles a utilização da orceína acética, do carmim acético e do reativo de Alexander.

A metodologia que se utiliza do reativo de Alexander permite a distinção entre polens viáveis e inviáveis, colorindo de forma diferenciada a celulose da parede do grão de pólen e o protoplasma (ALEXANDER, 1980). O carmim acético cora em vermelho o material genético do citoplasma dos pólen, por isso os grãos viáveis mostram-se vermelhos, enquanto os grãos inviáveis são transparentes ou não corados (PAGLIARINI; POZZOBON, 2004). E, a orceína acética, segundo Paula (2009), cora ambos os polens em vermelho, sendo realizada a distinção entre viáveis e inviáveis apenas pela intensidade da cor.

*Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (hortelã-do-campo), pertencente à família Lamiaceae, é uma espécie vegetal utilizada na medicina popular para a regulação da menstruação, sendo considerada emenagoga, e é também usada como estimulante natural (MORS et al., 2000), além de suas raízes serem consideradas antisépticas e anti-inflamatórias (FRONZA et al., 2011). Visando fornecer informações a respeito da espécie, o presente estudo objetivou estimar a viabilidade polínica de diferentes acessos de *P. longipes* no estado do Rio Grande do Sul, através de três métodos colorímetros distintos, além de determinar o corante mais eficiente para a técnica nessa espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material botânico constou de 15 acessos de *P. longipes* coletados em cinco municípios distintos: Santa Maria, Tupanciretã, São Pedro do Sul, São Vicente do Sul e Rosário do Sul, no estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil (Tabela 1). Os municípios possuem as seguintes



localizações geográficas, respectivamente: 29° 41' 2" S, 53° 48' 25" W, 29° 4' 51" S, 53° 50' 9" W, 29° 37' 15" S, 54° 10' 44" W, 29° 41' 31" S, 54° 40' 44" W e 30° 15' 28" S, 54° 54' 50" W. Quanto à altitude, esses municípios diferem entre si, apresentando respectivamente: 151m, 400m, 173m, 129m, 132m. O experimento foi desenvolvido no laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN), Centro de Ciências Naturais e Exatas, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Os acessos de *P. longipes* foram coletados no decorrer do mês de dezembro de 2013, segundo (MORI et al., 1989) e o material-testemunho foi incorporado ao herbário SMDB do Departamento de Biologia, UFSM.

**Tabela 1** – Acessos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. depositados no Herbário SMDB-UFSM como material-testemunho.

<b>Acesso</b>	<b>Nº Herbário SMDB</b>	<b>Município</b>
1	15406	Santa Maria
2	15416	Santa Maria
3	15417	Santa Maria
4	15418	Santa Maria
5	15412	Tupanciretã
6	15407	São Pedro do Sul
7	15408	São Pedro do Sul
8	15413	São Pedro do Sul
9	15409	São Vicente do Sul
10	15410	São Vicente do Sul
11	15411	São Vicente do Sul
12	15414	São Vicente do Sul
13	15415	São Vicente do Sul
14	15419	Rosário do Sul
15	15420	Rosário do Sul

As inflorescências dos 15 acessos foram fixadas, imediatamente após a coleta, em etanol:ácido acético (3:1) durante 24 horas e, posteriormente, transferidas para etanol 70% onde ficaram armazenadas sob refrigeração. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das anteras e coradas (GUERRA; SOUZA, 2002). Foram utilizados três métodos colorímetros distintos, a orceína acética 2%, o carmim acético 2% e o reativo de Alexander, que possibilitaram,

além de estimar a viabilidade polínica, determinar o corante mais eficiente para a técnica na espécie em estudo. Para a orceína, foram considerados viáveis os grãos de pólen fortemente corados e, inviáveis, os que apresentaram coloração muito fraca. Para o carmim acético, foram considerados viáveis aqueles grãos de pólen corados em vermelho, enquanto os transparentes ou não corados, foram ditos inviáveis. E, para o reativo de Alexander, os grãos de pólen de coloração púrpura foram considerados viáveis e, os grãos de pólen de coloração verde-claro-azulado, inviáveis.

Foram utilizadas duas repetições, em delineamento inteiramente casualizado, sendo preparadas duas lâminas para cada método colorímetro e contados 400 grãos de pólen por lâmina, totalizando 800 polens por método colorímetro e 2400 por acesso. Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Apresenta-se, a seguir, a estimativa da viabilidade polínica dos 15 acessos de *P. longipes*. As médias de grãos de pólen viáveis e da viabilidade polínica, para os três métodos colorímetros, estão expostas na Tabela 2.

As porcentagens de viabilidade polínica dos acessos de *P. longipes* variaram de 57,5 a 100% e, quando comparadas as médias de viabilidade polínica para cada um deles, foram encontradas diferenças significativas que possivelmente são consequência da existência de variabilidade genética entre os distintos acessos. Resultados semelhantes também foram observados por Neto et al. (2006), que encontraram diferenças na viabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e atribuíram esses dados à possibilidade de variabilidade genética.

**Tabela 2** – Médias de grãos de pólen viáveis e da viabilidade polínica dos acessos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. para os três métodos colorímetros utilizados (SM = Santa Maria; TP = Tupanciretã; SPS = São Pedro do Sul; SVS = São Vicente do Sul; RDS = Rosário do Sul; OA = Orceína acética 2%; CA = Carmim acético 2%; RA = Reativo de Alexander).

Acesso	Município	Média de grãos de pólen viáveis			Média de viabilidade polínica (%)		
		OA	CA	RA	OA	CA	RA
1	SM	400 <sup>aA</sup>	347,5 <sup>aB</sup>	339,5 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	86,87 <sup>aB</sup>	84,87 <sup>aB</sup>
2	SM	400 <sup>aA</sup>	300 <sup>bB</sup>	342 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	75 <sup>bB</sup>	85,5 <sup>aB</sup>
3	SM	400 <sup>aA</sup>	374 <sup>aB</sup>	349 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	93,5 <sup>aB</sup>	87,25 <sup>aB</sup>
4	SM	400 <sup>aA</sup>	394,5 <sup>aB</sup>	394,5 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	98,62 <sup>aB</sup>	98,62 <sup>aB</sup>
5	TP	400 <sup>aA</sup>	393,5 <sup>aB</sup>	393 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	98,37 <sup>aB</sup>	98,25 <sup>aB</sup>
6	SPS	400 <sup>aA</sup>	389 <sup>aB</sup>	382,5 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	97,25 <sup>aB</sup>	95,62 <sup>aB</sup>
7	SPS	400 <sup>aA</sup>	361 <sup>aB</sup>	382 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	90,25 <sup>aB</sup>	95,5 <sup>aB</sup>
8	SPS	400 <sup>aA</sup>	348,5 <sup>aB</sup>	331 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	87,12 <sup>aB</sup>	82,75 <sup>aB</sup>
9	SVS	397,5 <sup>bA</sup>	346,5 <sup>aB</sup>	351,5 <sup>aB</sup>	99,37 <sup>bA</sup>	86,62 <sup>aB</sup>	87,87 <sup>aB</sup>
10	SVS	399,5 <sup>aA</sup>	396,5 <sup>aB</sup>	340 <sup>aB</sup>	99,87 <sup>aA</sup>	99,12 <sup>aB</sup>	85 <sup>aB</sup>
11	SVS	399,5 <sup>aA</sup>	269 <sup>bB</sup>	340 <sup>aB</sup>	99,87 <sup>aA</sup>	67,25 <sup>bB</sup>	85 <sup>aB</sup>
12	SVS	400 <sup>aA</sup>	363 <sup>aB</sup>	398 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	90,75 <sup>aB</sup>	99,5 <sup>aB</sup>
13	SVS	399 <sup>aA</sup>	300 <sup>bB</sup>	342 <sup>aB</sup>	99,75 <sup>aA</sup>	75 <sup>bB</sup>	85,5 <sup>aB</sup>
14	RDS	400 <sup>aA</sup>	230 <sup>bB</sup>	252 <sup>bB</sup>	100 <sup>aA</sup>	57,5 <sup>bB</sup>	63 <sup>bB</sup>
15	RDS	400 <sup>aA</sup>	393,5 <sup>aB</sup>	398 <sup>aB</sup>	100 <sup>aA</sup>	98,37 <sup>aB</sup>	99,5 <sup>aB</sup>

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Apenas o acesso 9, de acordo com o método da orceína acética 2%, apresentou viabilidade menor (99,37%), diferindo estatisticamente dos demais. O mesmo se observa para os acessos 2 (75%), 11 (67,25%), 13 (75%), e 14 (57,5%) ao ser utilizado o corante carmim acético 2% e apenas para o acesso 14 (63%) com o reativo de Alexander (Tabela 2). No entanto, apenas os acessos 11 (São Vicente do Sul), com o corante carmim acético 2%, e 14 (Rosário do Sul), com os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander, apresentaram viabilidade inferior a 70%. Para os demais acessos foram observados valores acima de 70%, o que segundo Souza et al. (2002) indica alta viabilidade polínica.

Outros autores também encontraram um alto percentual de viabilidade polínica para diferentes espécies utilizadas na medicina popular. Frescura et al. (2012) observaram uma alta viabilidade polínica para a maioria das populações de *Polygala paniculata* L. analisadas utilizando-

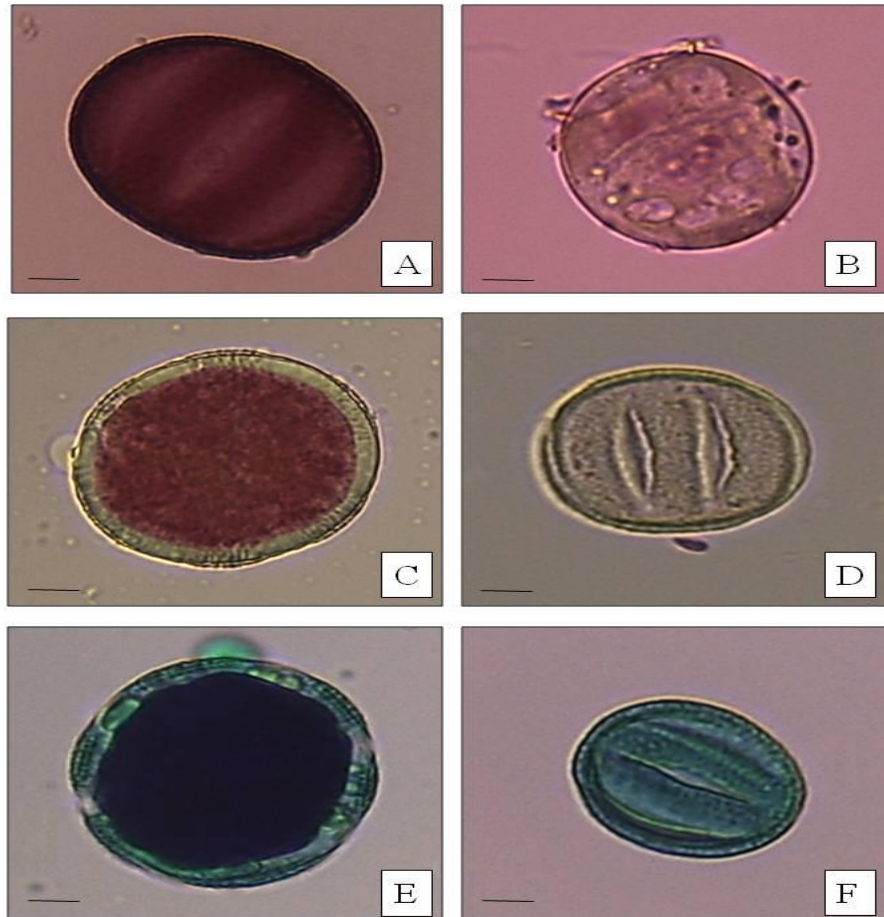
se o reativo de Alexander. Ao estudarem acessos de *Crotalaria juncea* L., Coelho et al. (2012) encontraram viabilidade polínica acima de 80% para sete dos 10 acessos estudados através da metodologia com reativo de Alexander e acima de 96% para todos os 10 acessos observados com o uso da orceína acética. E, Piccinini et al. (2012), ao analisarem diferentes genótipos de *Eragrostis plana* Nees, observaram viabilidade polínica alta em todos os genótipos através do uso da orceína acética e do reativo de Alexander.

Em relação aos diferentes métodos colorímetros, foi possível observar que os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander foram mais eficientes na distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis do que a orceína acética 2%, que diferiu significativamente dos outros dois métodos na estimativa realizada para todos os acessos de *P. longipes* (Tabela 2).

Em 11 dos 15 acessos de *P. longipes* avaliados com orceína acética 2%, todos os grãos de pólen foram fortemente corados em vermelho, o que indica, segundo essa metodologia, que todos eles eram viáveis. A mesma porcentagem de viabilidade polínica não foi observada em nenhum dos acessos de *P. longipes* quando analisados com os outros dois métodos colorímetros, já que nestes casos, a diferenciação da coloração entre os grãos de pólen proporcionou uma melhor visualização de polens viáveis ou inviáveis. Esses resultados evidenciam a possibilidade de superestimação da viabilidade polínica pelo método com orceína acética e, por consequência, demonstram a eficácia do carmim acético e do reativo de Alexander, que propiciaram uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 1).

Por corar de forma diferenciada a parede do grão de pólen e o protoplasma, o reativo de Alexander permite diferenciar facilmente polens abortados de polens não abortados pela ausência ou presença de núcleo (ALEXANDER, 1980). Diversos estudos vem comprovando a eficiência desse corante na técnica de estimativa da viabilidade polínica. Auler et al. (2006), usando carmim propiônico 2%, orceína acética 2% e reativo de Alexander, na análise da espécie medicinal *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), concluíram que o reativo de Alexander foi o método mais eficaz para estimar a viabilidade dos grãos de pólen. Coelho et al. (2012) também obtiveram

resultados mais satisfatórios com o reativo de Alexander do que com a orceína acética na análise da viabilidade polínica de *Crotalaria juncea*.



**Figura 1** – Grãos de pólen de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. A) grão de pólen viável corado com orceína acética 2%; B) grão de pólen inviável corado com orceína acética 2%; C) grão de pólen viável corado com carmim acético 2%; D) grão de pólen inviável corado com carmim acético 2%; E) grão de pólen viável corado com reativo de Alexander; F) grão de pólen inviável corado com reativo de Alexander. Escala representa 10 $\mu$ m.

Apesar de comprovada a maior eficiência do reativo de Alexander por diferentes pesquisadores, neste trabalho, o carmim acético também demonstrou êxito na distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis de acessos de *P. longipes* (Figura 1), levando a resultados tão satisfatórios quanto àqueles obtidos através do método com o reativo de Alexander, não possuindo diferença significativa quando comparados (Tabela 2).

Segundo Almeida et al. (2006), para a estimativa da viabilidade polínica do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.), o carmim acético foi o método mais indicado, quando comparado aos corantes orceína acética, lugol, e azul-de-amã. Também, em estudo sobre a viabilidade polínica de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.), o uso do corante carmim acético 2% foi considerado adequado, permitindo uma boa diferenciação de polens viáveis e inviáveis (VARGAS, 2006). E, para a distinção de polens do gênero *Capsicum* L., o carmim acético também demonstrou eficácia (MARTINS, 2010).

## **CONCLUSÃO**

Em 13 dos 15 acessos de *P. longipes*, independentemente do método usado, foi observada alta viabilidade polínica, com valores acima de 75%. Além disso, verificou-se que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica, no entanto, o carmim acético 2% e o reativo de Alexander permitiram uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis, sendo os dois últimos mais eficientes para a técnica nessa espécie.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CAPES) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a quem expressamos nossa gratidão.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.5, n.1, p. 13-18, 1980.

ALMEIDA, O. S.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 343-348, 2004.

ALMEIDA, O. S.; RIBEIRO, G. S.; ALVES, J. S. A.; SILVA, A. B.; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Estimativa da viabilidade polínica em espécies do gênero *Ocimum* com diferentes corantes.. In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. **Anais... Horticultura Brasileira**. Brasília: ABH, v. 24. p. 242-242, 2006.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v.6, n.2, p.1-6, 2005.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, p.55-63, 2006.

COELHO, A. P. D.; MORAIS, K. P.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; GIACOMINI, S. J.; TEDESCO, S. B. pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). **Agrociencia**, v. 46, p. 481-487, 2012.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; MALAGI, G. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.2, 2011.

FACANALI R. **Estudo da biologia reprodutiva, diversidade genética e química de populações de *Ocimum selloi* benth.** 2008. 145 f. Tese de doutorado em Agronomia (Horticultura), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, SP, 2008.

FEREIRA, C. A.; PINHO, E. V. R. V.; ALVIM, P. O.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, p. 159-173, 2007.

FEIJÓ, A. M.; BUENO, M. E. N.; CEOLIN, T.; LINCK, C. L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S. M. K.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas

por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** [online], v14, n.1, p. 50-56, 2012.

FRESCURA, V. D.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; CANTODOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v. 36, n. 3, p. 143-145, 2012.

FRONZA, M.; MURILLO, R.; LUSARCZYK, S. S.; ADAMS, M.; HAMBURGER, M.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.; MERFORT, I. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 4876–4881, 2011.

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

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994. 220p.

MARTINS, K. C. **Palinologia de *Capsicum* spp.: caracterização, divergência e viabilidade polínica**. 2010. 124f. (Dissertação de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, RJ. 2010.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, p. 1- 19, 2002.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de Manejo de Herbário Fanerogâmico**. Bahia: Centro de Pesquisas do Cacau, 24. ed. 1989. 104p.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan, 2000. 501 p.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.4, n.1, p. 67-74, 2006.



PAGLIARINI e POZZOBON. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 2004.

PAULA, J. M. **Caracterização e manejo de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glifosato**. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas. 2009.

PICCININI, F.; FRESCURA, V. D.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PEREZ, N. B.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Eragrostis plana* genotypes from different geographic populations in rio grande do sul. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 13-16, 2012.

PIO, L. A.; RAMOS, D. J.; PASCAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 147-153, 2007.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa degener*). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. 2006. 98 f. Dissertação de mestrado. Em fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2006.

## ARTIGO 2

### **Análises genotóxica e cromatográfica dos extratos aquosos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (hortelã-do-campo)**

#### **RESUMO**

*Peltodon longipes* Kunth ex Benth. é utilizada como estimulante e emenagoga. Objetivou-se realizar análises genotóxica e cromatográfica dos extratos de dois acessos de *P. longipes*, coletados nos municípios de Santa Maria e Tupanciretã, RS, Brasil. O teste de *Allium cepa* foi utilizado para análise da genotoxicidade e, a cromatografia líquida de alta eficiência, para determinação dos compostos fenólicos. O experimento de genotoxicidade constou de nove grupos de quatro bulbos de *A. cepa*. Os bulbos foram enraizados em água destilada e após transferidos para os tratamentos, por 24 horas, permanecendo o controle negativo em água. Os tratamentos foram: extratos aquosos nas concentrações de 5 e 15g.L<sup>-1</sup> de cada acesso, além de quatro grupos tratados com glifosato 1%, um deles usado como controle positivo e outros três para testar a recuperação de danos ao DNA utilizando água e os extratos de *P. longipes* do acesso de Santa Maria. Extratos dos dois acessos de *P. longipes* demonstraram potencial antiproliferativo, porém o efeito foi significativamente maior para os extratos do acesso de Tupanciretã. Esse acesso também apresentou maior quantidade de ácido rosmarínico e canferol, o que pode estar relacionado com os efeitos encontrados nesses extratos. Somente os extratos do acesso de Santa Maria demonstraram potencial genotóxico.

**Palavras-chave:** Efeito antiproliferativo. Potencial genotóxico. Teste de *Allium cepa*.

## ABSTRACT

*Peltodon longipes* Kunth ex Benth. is used as a stimulant and emmenagogue. The objective of this study was to perform genotoxic and chromatographic analyses of the extracts of two accesses of *P. longipes*, collected from the cities of Santa Maria and Tupanciretã, RS, Brazil. The *Allium cepa* assay was used to analyze genotoxicity while high-performance liquid chromatography was employed to determine phenolic compounds. The genotoxicity experiment consisted of nine groups each comprising four *A. cepa* bulbs. Bulb roots were developed in distilled water and then transferred for the treatments, for 24 hours, and the negative control remained in water. The treatments were: aqueous extracts at concentrations of 5 and 15g.L<sup>-1</sup> for each access, plus four groups treated with 1% Glyphosate, one of which was used as a positive control and the other three for testing DNA damage recovery using water and the extracts of *P. longipes* from Santa Maria. Extracts of two access of *P. longipes* exhibited anti-proliferative potential, although the effect was significantly greater for the extracts from the Tupanciretã access. This access also contained the highest amount of rosmarinic acid and kaempferol, which may confer the effects found in these extracts. Only the extracts from the Santa Maria access exhibited genotoxic potential.

**Key-words:** Antiproliferative effect. Genotoxic potential. *Allium cepa* test.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Peltodon longipes* Kunth ex Benth, pertencente à família Lamiaceae, é encontrada na região sul do Brasil e possui como sinônimo *P. comaroides* Briq. (Briquet, 1989). A planta é conhecida popularmente como hortelã-do-campo (Lorenzi, Matos, 2008) e é utilizada na medicina popular como estimulante e emenagoga (Mors *et al.*, 2000), e suas raízes são usadas como antiséptico e anti-inflamatório (Fronza *et al.*, 2011). A análise de tecidos dessa espécie, feita através de estudos químicos, mostrou a presença de ácido ursólico (Zelnik *et al.*, 1978/79), uma substância presente no grupo das saponinas triterpênicas, as quais são encontradas principalmente em dicotiledôneas (Simões *et al.*, 2004). Além disso, em trabalho realizado por Fronza *et al.* (2012), foram isolados da planta cinco diterpenos (7-alfa-acetox royleanona, horminona, royleanona, 7-ketoroyleanona e sugiol) que demonstraram possuir atividade citotóxica contra um tipo de células de câncer pancreático humano. Esses

diterpenos também influenciaram na progressão do ciclo celular e, exibiram apenas uma pequena capacidade de indução à morte celular por apoptose, não gerando espécies reativas de oxigênio intracelular.

Muitas vezes, em comunidades e grupos étnicos, o único recurso disponível para tratamento e prevenção de doenças é o conhecimento sobre a utilização medicinal das plantas. Em certas regiões do Brasil, mesmo em grandes cidades, espécies vegetais utilizadas na medicina alternativa são comercializados em feiras e mercados. E a população em geral se utiliza desse tipo de recurso tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos, mesmo que seus constituintes químicos nem sempre sejam conhecidos e suficientemente estudados (Maciel *et al.*, 2002).

Muitos estudos laboratoriais têm encontrado nas espécies vegetais um grande número de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos (De Marini, 1998), mas apesar das vantagens terapêuticas alguns dos constituintes dessas plantas podem ser potencialmente tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos (Ping *et al.*, 2012). Porém, o potencial de toxicidade das plantas medicinais não é reconhecido pela população em geral e por grupos de profissionais da medicina tradicional (Soetan, Aiyelaagbe, 2009), e por isso gera a necessidade de estudos que visem a análise dos efeitos genotóxicos das plantas medicinais.

A maioria dos sistemas de ensaio de toxicidade dependem de pequenos animais, assim, são demorados, muito caros, e atraem críticas (Fatima, Ahmad, 2006; Siddiqui *et al.*, 2011). No entanto, existem bioensaios que utilizam plantas como organismos teste na detecção de genotoxicidade e citotoxicidade que destacam-se por serem simples de executar, rápidos, de baixo custo, e biologicamente sensíveis (Fatima, Ahmad, 2006; Morais, Marin-Morales, 2009). Dentre os organismos que apresentam diversas vantagens está a cebola (*Allium cepa* L.), que garante um ensaio de baixo custo, apresentando fácil manuseio e características cromossômicas adequadas (Bich *et al.*, 2012). O teste tem sido utilizado para avaliação de danos no DNA (Leme, Marin-Morales, 2009) e facilita a avaliação de distúrbios no ciclo celular (De Rainho *et al.*, 2010).

Além dos testes de toxicidade, o perfil cromatográfico de um extrato vegetal também é essencial, já que pode ser considerado um representativo da complexidade química da amostra, possibilitando avaliar a relação entre a informação química e as características de cada amostra vegetal, tais como a diferenciação entre espécies botanicamente semelhantes e a variabilidade entre plantas coletadas em diferentes locais geográficos, em diferentes condições climáticas e de cultivo (Chen *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011).

Dentro desse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e antiproliferativos dos extratos das folhas de dois acessos de *P. longipes*, coletadas nos municípios de Santa Maria e Tupanciretã, Rio Grande do Sul, Brasil, além de determinar os compostos fenólicos presentes nesses extratos por meio de análise cromatográfica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Análise genotóxica pelo teste de *Allium cepa***

As folhas de dois acessos de *P. longipes* foram coletadas em dois municípios distintos, Santa Maria e Tupanciretã, Rio Grande do Sul, Brasil, com as localizações geográficas 29°42'19.8"S 53°43'44.6"W e 29°03'56.0"S 53°50'33.8"W, e altitudes de 151m e 400m, respectivamente. A coleta foi realizada em dezembro de 2013 e, após a secagem do material vegetal, em fevereiro de 2014, iniciou-se os procedimentos do experimento. As plantas foram identificadas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thais do Canto-Dorow e o material-testemunho dos acessos de Santa Maria e Tupanciretã encontram-se no herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia), UFSM, sob os números de registro 15406 e 15412, respectivamente.

Os extratos aquosos foram preparados em duas concentrações, 5g.L<sup>-1</sup> e 15g.L<sup>-1</sup>, sendo, a menor concentração, geralmente utilizada pela população no preparo de extratos medicinais de diferentes espécies vegetais. As folhas secas foram colocadas em água fervente e permaneceram em infusão por 10 minutos, posteriormente os extratos foram coados e colocados para esfriar em temperatura ambiente.

Para a instalação do experimento utilizou-se 36 bulbos de *A. cepa*, que corresponderam a nove grupos com quatro repetições cada. Os bulbos foram enraizados em água destilada e, após a emissão das raízes, cada grupo de cebolas foi transferido para seu respectivo tratamento. O primeiro grupo foi usado como controle negativo, permanecendo em água destilada, e os outros foram transferidos para os seguintes tratamentos: extrato aquoso de *P. longipes* na concentração de 5g.L<sup>-1</sup> (acesso Santa Maria), extrato aquoso de *P. longipes* na concentração de 5g.L<sup>-1</sup> (acesso Tupanciretã), extrato aquoso de *P. longipes* na concentração de 15g.L<sup>-1</sup> (acesso Santa Maria), extrato aquoso de *P. longipes* na concentração de 15g.L<sup>-1</sup> (acesso Tupanciretã) e quatro grupos tratados com glifosato 1%, sendo um destes grupos usado como controle positivo e os outros três para testar a possível recuperação de danos ao DNA em água destilada, extrato aquoso de *P. longipes* na menor concentração e extrato

aquoso de *P. longipes* na maior concentração, ambos preparados com folhas do acesso Santa Maria.

Os bulbos permaneceram nos tratamentos durante 24 horas e em seguida as radículas foram coletadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24h. Após as radículas foram mantidas em álcool 70% sob refrigeração até o preparo das lâminas. Foram feitas duas lâminas por bulbo de cebola de cada tratamento e controle. No preparo das lâminas, utilizou-se uma radícula por lâmina, ou seja, foram analisadas duas radículas por bulbo. Estas foram hidrolisadas em HCl 1N por cinco minutos e, então, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. A região meristemática das radículas foi fragmentada com o auxílio de agulhas histológicas, esmagada segundo a técnica de Guerra e Souza (2002) e a lamínula colocada sobre o material. Foram analisadas 500 células por radícula, 1000 por bulbo, totalizando 4000 células por tratamento e 36000 células ao final do experimento. As lâminas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico (LEICA) com a objetiva de 40X observando-se células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase e a possível ocorrência de alterações cromossômicas durante o ciclo celular. Após a análise das lâminas foi determinado o Índice Mitótico (IM) utilizando-se o número de células em divisão dividido pelo total de células analisadas multiplicado por 100.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)**

A cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada para a determinação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *P. longipes*. A análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

#### **Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais**

Todos os reagentes químicos foram de grau analítico. Acetonitrila, ácido fórmico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico e ácido rosmarínico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A quercetina e o canferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT, conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, detector de arranjos de diodo SPD-M20A e software LC solution 1.22 SP1.

### Quantificação dos compostos através de CLAE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa sob condições de gradiente utilizando coluna C<sub>18</sub> (4,6mm x 150mm) carregada com partículas de diâmetro 5µm, a fase móvel utilizada foi água contendo 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), o gradiente de composição foi: 13% de B durante 10 min e modificado até obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% e 10% B em 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Kamdem *et al.* (2013) com pequenas modificações. Os extratos aquosos das folhas dos dois acessos de *P. longipes*, além da fase móvel, foram filtrados através de um filtro de membrana de 0.45 µm (Millipore) e desgaseificadas por banho de ultrassom antes do uso. As amostras de *P. longipes* foram analisadas na concentração de 5 e 15 g.L<sup>-1</sup>. O fluxo usado foi de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, o volume de injeção de 50 mL e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 327 nm para o ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico e ácido elágico, e 366 nm para quercetina e canferol. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultra-som antes da utilização. As soluções de referência foram preparadas na fase móvel para CLAE nas concentrações de 0.025 – 0.300 mg.mL<sup>-1</sup> para quercetina e canferol; e 0.050 – 0.450 mg.mL<sup>-1</sup> para ácido elágico, gálico, rosmarínico, clorogênico e cafeico. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os dos padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). A curva de calibração para o ácido gálico foi:  $Y = 12674x + 1375.6$  ( $r = 0.9998$ ); ácido clorogênico:  $Y = 11863x + 1274.9$  ( $r = 0.9998$ ); ácido cafeico:  $Y = 13592x + 1367.1$  ( $r = 0.9999$ ); ácido elágico:  $Y = 13286x + 1264.1$  ( $r = 0.9997$ ); ácido rosmarínico:  $Y = 12837x + 1364.5$  ( $r = 0.9994$ ); quercetina:  $Y = 13627x + 1292.5$  ( $r = 0.9996$ ) and canferol:  $Y = 11794x + 1326.6$  ( $r = 0.9999$ ). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas, e a inclinação, usando três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como 3.3 e 10  $\sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta, e S é a inclinação da curva de calibração (Boligon *et al.*, 2013).

## **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa Assistat 7.7 beta.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise genotóxica pelo teste de *Allium cepa***

De acordo com os resultados obtidos no experimento de análise da genotoxicidade (Tabela I), o maior valor de índice mitótico (IM) foi observado para o controle negativo em água destilada (IM = 11,7%). Para os tratamentos utilizando extratos aquosos preparados com as folhas de *P. longipes*, quando comparados aos resultados do controle negativo, foi observado uma redução significativa dos índices mitóticos em ambas concentrações e acessos estudados, demonstrando assim, que os extratos da planta apresentaram potencial antiproliferativo. O mesmo efeito foi encontrado por Sturbelle *et al.* (2008) em estudo utilizando o teste da cebola para avaliar duas concentrações de solução de babosa (*Aloe vera* L.), 40 e 400 mL.L<sup>-1</sup>, onde os resultados demonstraram inibição da divisão celular com a utilização dessas soluções sobre as células meristemáticas de cebola.

Levando em consideração que foram estudados extratos de plantas coletadas em distintos municípios, foi possível observar que aqueles tratamentos com extratos de mesma concentração, porém de acessos diferentes, apresentaram diferenças entre si, pois os índices mitóticos diferiram significativamente. Já os tratamentos com extratos de um mesmo acesso, mesmo em diferentes concentrações, demonstraram efeitos semelhantes sobre a divisão celular de *A. cepa*. Sendo assim, foi possível notar que esse efeito antiproliferativo foi significativamente maior para os tratamentos com extratos das folhas coletadas no acesso de Tupanciretã (IM = 1,32 e 0,87%). Esses resultados podem ser explicados devido a possibilidade de variação das taxas de produção dos metabólitos secundários das plantas estudadas, pois já se sabe que esses metabólitos representam uma interface química entre as plantas e que sua síntese frequentemente é afetada pelo o ambiente circundante (Kutchan, 2001). De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), diferentes fatores podem interferir na produção de metabólitos secundários, como índice pluviométrico, sazonalidade, temperatura



e, também, a altitude que pode apresentar relação positiva com a síntese de flavonóides nas espécies vegetais.

TABELA I- Número total de células, células em intérfase, células em divisão e índice mitótico (IM%) observados no teste de genotoxicidade de dois acessos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (SM = Santa Maria; TP = Tupanciretã; Rec. = Recuperação).

Tratamentos	Nº Total de Células	Células. em Intérfase	Células em Divisão	IM%
Controle negativo (água destilada)	4000	3532	468	11,7 <sup>a</sup>
Extrato de 5g.L <sup>-1</sup> (SM)	4000	3808	192	4,8 <sup>b</sup>
Extrato de 5g.L <sup>-1</sup> (TP)	4000	3947	53	1,32 <sup>c</sup>
Extrato de 15g.L <sup>-1</sup> (SM)	4000	4779	221	5,52 <sup>b</sup>
Extrato de 15g.L <sup>-1</sup> (TP)	4000	3965	35	0,87 <sup>c</sup>
Controle positivo (Glifosato 1%)	4000	3901	99	2,47 <sup>c</sup>
Glifosato + Rec. água destilada	4000	3945	55	1,37 <sup>c</sup>
Glifosato + Rec. extrato 5g.L <sup>-1</sup> (SM)	4000	3895	105	2,62 <sup>c</sup>
Glifosato + Rec. extrato 15g.L <sup>-1</sup> (SM)	4000	3961	39	0,97 <sup>c</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos índices mitóticos do controle positivo (glifosato 1%) e dos tratamentos com glifosato que testaram a possibilidade de recuperação de danos ao material genético através da posterior utilização de água destilada ou extratos de *P. longipes* (acesso de Santa Maria), não foram encontradas diferenças significativas entre eles, sendo a taxa de divisão celular semelhante entre o controle positivo e estes três tratamentos de recuperação.

No que diz respeito à porcentagem de alterações encontradas (Tabela II e Figura 1) o controle positivo com glifosato 1% foi quem causou à maior porcentagem de danos ao DNA (0,72%), diferindo significativamente dos demais tratamentos estudados. Isso ocorre devido a capacidade de indução de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* através do uso do glifosato, o que já foi observado por Souza *et al.* (2010).

Entre os tratamentos com extratos de *P. longipes* na concentração usual (5g.L<sup>-1</sup>) e na maior concentração (15g.L<sup>-1</sup>), levando em consideração a porcentagem de alterações cromossômicas, houve diferença significativa entre os extratos aquosos obtidos a partir de

plantas de acessos distintos. Os tratamentos com extratos de folhas de Santa Maria apresentaram aumento significativo da porcentagem de alterações cromossômicas quando comparados ao controle em água destilada, demonstrando potencial genotóxico. Já os tratamentos com extratos aquosos provenientes de plantas coletadas em Tupanciretã não demonstraram diferença significativa em relação ao controle negativo. Por isso, os tratamentos com extratos do acesso de Tupanciretã, além de possuírem grande potencial antiproliferativo não apresentaram atividade genotóxica.

TABELA II- Porcentagem de alterações cromossômicas encontradas em 4000 células analisadas por tratamento no teste de genotoxicidade de dois acessos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (SM= Santa Maria; TP= Tupanciretã; Rec.= Recuperação; MN= Micronúcleo em intérfase; Q= Quebra cromossômica; P= Ponte cromossômica).

Tratamentos	Total de células com alterações	Alterações cromossômicas no ciclo celular			% alterações cromossômicas
		MN	Q	P	
Controle negativo (água destilada)	0	0	0	0	0 <sup>c</sup>
Extrato de 5g.L <sup>-1</sup> (SM)	12	0	1	11	0,3 <sup>b</sup>
Extrato de 5g.L <sup>-1</sup> (TP)	2	2	0	0	0,05 <sup>c</sup>
Extrato de 15g.L <sup>-1</sup> (SM)	14	3	2	9	0,35 <sup>b</sup>
Extrato de 15g.L <sup>-1</sup> (TP)	2	2	0	0	0,05 <sup>c</sup>
Controle positivo (Glifosato 1%)	29	8	7	14	0,72 <sup>a</sup>
Glifosato + Rec. água destilada	3	0	0	3	0,07 <sup>c</sup>
Glifosato + Rec. extrato 5g.L <sup>-1</sup> (SM)	12	1	5	6	0,3 <sup>b</sup>
Glifosato + Rec. extrato 15g.L <sup>-1</sup> (SM)	4	1	2	1	0,1 <sup>c</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A presença do efeito antiproliferativo e a ausência de genotoxicidade também foi observada por Frescura *et al.* (2013), quando testados os extratos de *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton pelo teste de *A. cepa*, demonstrando redução do IM através do tratamento com os extratos na menor (5g.L<sup>-1</sup>) e na maior (20g.L<sup>-1</sup>) concentração estudada, além de causarem pouquíssimas alterações cromossômicas, constatando-se assim, a ausência do potencial genotóxico. Extratos de *Pterocaulon polystachyum* DC. (Knoll *et al.*, 2006) também apresentaram efeitos semelhantes quando analisados pelo mesmo teste, enquanto que as

espécies *Baccharis trimera* (Less) DC. e *B. articulata* (Lam.) Pers. (Fachinetto, Tedesco, 2009) demonstraram atividade antiproliferativa, mas também potencial genotóxico, como os resultados observados para os extratos de *P. longipes* do acesso de Santa Maria.

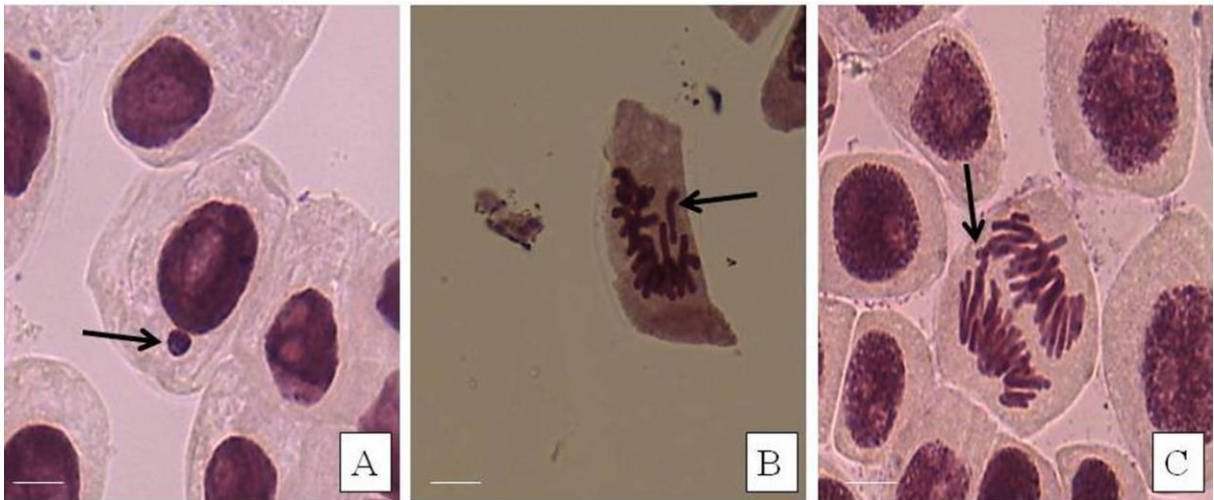


FIGURA 1– Alterações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A) seta indicando micronúcleo em intérfase; B) seta indicando quebra cromossômica em metáfase; C) seta indicando ponte cromossômica em anáfase. Escala representa 10 $\mu$ m.

Para os tratamentos que visavam a detecção de possível efeito antígenotóxico através da recuperação com água destilada e extratos de *P. longipes* (acesso de Santa Maria) na menor e maior concentração, os três tratamentos reduziram significativamente o aparecimento de alterações cromossômicas nas células meristemáticas de *A. cepa*, quando comparados ao controle positivo. Com a utilização da água destilada foi possível observar uma boa recuperação da divisão celular (0,07%), já que houve redução da porcentagem de alterações cromossômicas quando comparada ao controle positivo, que apresentou 0,72%. Resultados semelhantes foram encontrados por Frescura *et al.* (2013) que também avaliaram a recuperação das raízes de cebola através da aplicação de água destilada após o uso do glifosato e, nesse caso, a água também demonstrou ser eficiente na recuperação de danos ao DNA, sendo observado o decréscimo de 102 (glifosato 3%) para 41 (glifosato seguido de aplicação da água) alterações cromossômicas.

Nos tratamentos de recuperação através da aplicação dos extratos de *P. longipes*, somente a recuperação com o extrato de 5g.L<sup>-1</sup> (acesso de Santa Maria) diferiu significativamente da recuperação em água, porém demonstrou ser menos eficaz na redução dos danos causados pelo glifosato. Já o extrato de 15g.L<sup>-1</sup>, aplicado após o tratamento com glifosato, não diferiu significativamente da recuperação em água e, em razão disso, foi

igualmente eficaz. Deve-se levar em consideração que apesar do número de alterações cromossômicas ter sido significativamente maior em alguns tratamentos, quando comparados ao controle negativo, todos os valores foram baixos, sendo inferiores a 1% em relação ao total de células analisadas por tratamento (Tabela II).

### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Mesmo com a grande importância das plantas medicinais para a pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de fármacos, ainda são poucos os estudos que visam o conhecimento a respeito dos seus constituintes.

A análise dos extratos das folhas de *P. longipes* (Santa Maria e Tupanciretã), através da cromatografia líquida de alta eficiência, revelou a presença de ácido gálico ( $t_R = 9.86$  min; pico 1), ácido clorogênico ( $t_R = 19.47$  min; pico 2), ácido cafeico ( $t_R = 24.98$  min; pico 3), ácido elágico ( $t_R = 33.17$ ; pico 4), ácido rosmarínico ( $t_R = 38.06$  min; pico 5), quercetina ( $t_R = 41.25$  min; pico 6) e canferol ( $t_R = 56.61$  min; pico 7) (Figura 2 e Tabela III).

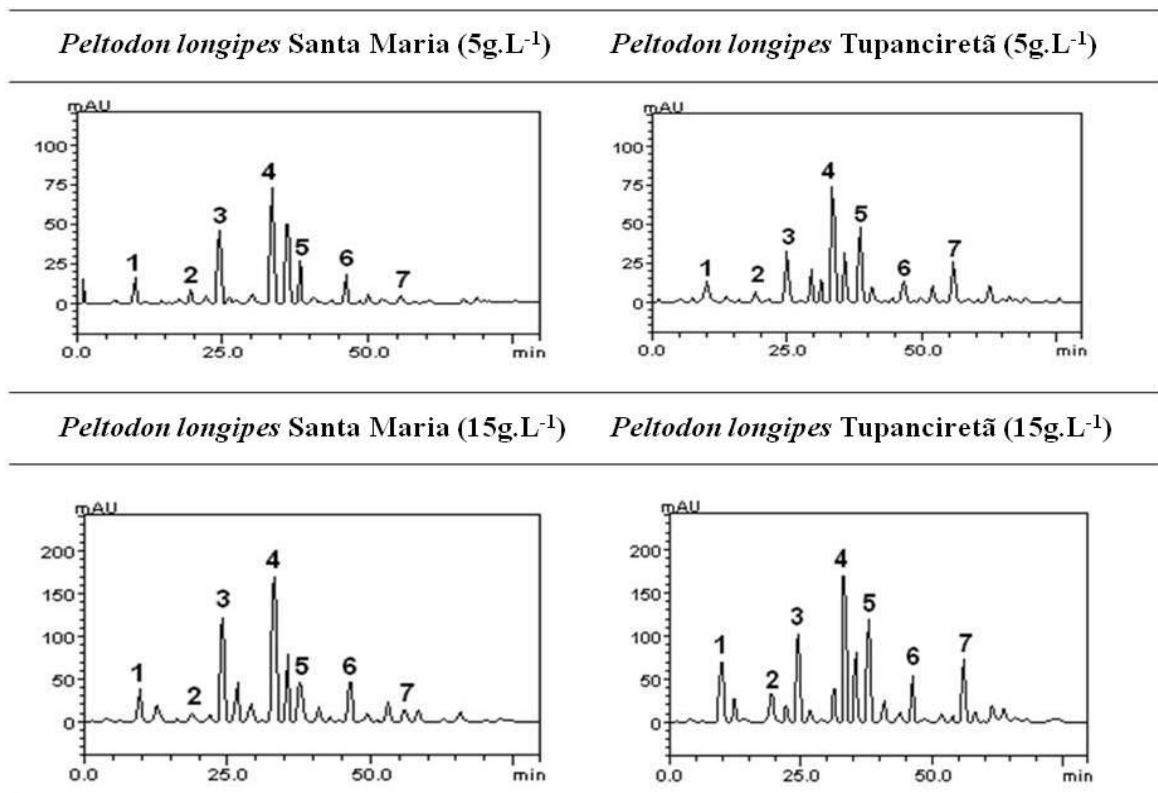


FIGURA 2 – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência de dois acessos de *Peltodon longipes* (Santa Maria e Tupanciretã). Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), ácido rosmarínico (pico 5), quercetina (pico 6) e canferol (pico 7).

**TABELA III** – Ácidos fenólicos e flavonóides dos extratos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (SM = acesso de Santa Maria; TP = acesso de Tupanciretã; LOD = Limite de detecção; LOQ = Limite de quantificação).

Compostos	SM	TP	SM	TP	LOD	LOQ
	(5g.L <sup>-1</sup> )	(5 g.L <sup>-1</sup> )	(15 g.L <sup>-1</sup> )	(15 g.L <sup>-1</sup> )		
	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	µg.mL <sup>-1</sup>	µg.mL <sup>-1</sup>
Ácido gálico	1,22 <sup>e</sup>	1,36 <sup>e</sup>	2,41 <sup>e</sup>	4,12 <sup>d</sup>	0.017	0.056
Ácido clorogênico	0,71 <sup>f</sup>	0,64 <sup>g</sup>	0,65 <sup>f</sup>	2,21 <sup>f</sup>	0.009	0.029
Ácido caféico	3,47 <sup>b</sup>	2,73 <sup>c</sup>	7,00 <sup>b</sup>	6,19 <sup>c</sup>	0.031	0.101
Ácido elágico	4,28 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	8,77 <sup>a</sup>	8,72 <sup>a</sup>	0.028	0.092
Ácido rosmarínico	1,97 <sup>c</sup>	3,48 <sup>b</sup>	3,12 <sup>d</sup>	6,84 <sup>b</sup>	0.026	0.085
Quercetina	1,42 <sup>d</sup>	1,22 <sup>f</sup>	3,18 <sup>c</sup>	2,89 <sup>e</sup>	0.014	0.045
Canferol	0,63 <sup>g</sup>	2,08 <sup>d</sup>	0,59 <sup>g</sup>	4,10 <sup>d</sup>	0.035	0.115

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Quando comparados os perfis cromatográficos dos extratos de diferentes acessos, Santa Maria e Tupanciretã, foram observadas diferenças entre as quantidades de alguns compostos, principalmente para o ácido rosmarínico (Figura 1 - pico 5) e para o canferol (Figura 1 – pico 7), onde essa diferença foi mais visível. Nos dois casos, os compostos apresentaram-se numa quantidade mais elevada no acesso de Tupanciretã, em ambas concentrações.

Essa quantidade mais elevada desses dois compostos pode estar associada ao elevado potencial antiproliferativo demonstrado pelos extratos das plantas do acesso de Tupanciretã, quando testadas pelo teste de *A. cepa*. Além da possibilidade da atividade antiproliferativa do ácido rosmarínico, outras atividades biológicas já foram atribuídas ao composto, dentre elas a propriedade antitumoral (Mckay, Blumberg, 2006) e também antimutagênica (Furtado *et al.*, 2008). Já em relação aos flavonóides, dentre eles encontrando-se o canferol, em geral são considerados benéficos, sendo que alguns medicamentos são elaborados a partir deles e utilizados no tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da

vitamina C, além de alguns ainda possuírem ação antitumoral, antiviral, anti-hemorrágica, hormonal, antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante (Simões *et al.*, 2004).

## **CONCLUSÃO**

Através dos resultados obtidos pelo teste de *A. cepa*, pode-se concluir que os extratos aquosos das folhas de *P. longipes* dos dois acessos estudados, em ambas as concentrações, apresentaram potencial antiproliferativo, porém esse efeito foi significativamente maior para os extratos do acesso de Tupanciretã. O acesso também apresentou maior quantidade de ácido rosmarínico e canferol, o que pode estar relacionado com o efeito antiproliferativo e a ausência de genotoxicidade de seus extratos. Já no que diz respeito aos extratos do acesso de Santa Maria, além de terem efeito antiproliferativo menor, também demonstraram potencial genotóxico.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CAPES) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a quem expressamos nossa gratidão.

## REFERÊNCIAS

- BICH, G. A.; VEDOYA, M. C.; MEDVEDEFF, M. G. Formulaci3n antifúngica basada en soluci3n saturada de sacarosa: evaluaci3n de su potencial actividad genot3xica empleando la prueba de *Allium cepa*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, v. 14, n. 18, 2012.
- BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; BRUM, T. F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; ATHAYDE, M. L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 2229-2239, 2013.
- BRIQUET, J. Fragmenta Monographiae Labiaturum I. – Bull. *Bulletin de la Société botanique de Genève*, v. 5, p. 20-122, 1889.
- CHEN, J.; LU, Y. -H.; WEI, D. -Z.; ZHOU, X. -L. Establishment of a Fingerprint of Raspberries by LC. *Chromatographia*, v.70, p.981, 2009.
- DE MARINI, D. M. Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 400, p. 457-465, 1998.
- DE RAINHO, C.; KAEZER, A.; AIUB, C. AND FELZENSZWALB, I. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in *N*-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 82, p. 925-932, 2010.
- FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol.11, no.4, p.360-367, 2009.
- FATIMA, R.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. *Mutation Research*, v. 909, p. 81–91, 2006.
- FURTADO, M. A. L.; ALMEIDA, C. F.; FURTADO, R. A.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.*, v. 657, n. 2, p. 150-154, 2008.
- FRESCURA, V. D.; KUHN, A. W.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PARANHOS, J. T.; TEDESCO, S. B. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a

partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. *Biocell*, v. 37, n. 2, p. 23-28, 2013.

FRONZA, M.; MURILLO, R.; LUSARCZYK, S. S.; ADAMS, M.; HAMBURGER, M.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.; MERFORT, I. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.19, p. 4876–4881, 2011.

FRONZA, M.; LAMY, E.; GÜNTHER, S.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. *Phytochemistry*, v. 78, p. 107–119, 2012.

GOBBO-NETO, L. e LOPES N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

KAMDEM, J. P.; OLALEKAN, E. O.; HASSAN, W.; KADE, I. J.; YETUNDE, O.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. *Trichilia catigua* (Catuba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 625-632, 2013.

KNOLL, M. F.; SILVA, A. C. F.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, v. 29, p. 539-542. 2006.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Plant Physiology*, vol. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3,



p. 429-438, 2002.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA, E. R. F.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, p. 469, 2011.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, v. 20, p. 619, 2006.

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

PING, K. Y.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules*, v. 17, p. 7782-7791, 2012.

SIDDIQUI, A.; TABRESZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 179, p 241–253, 2011.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. 821p.

SOETAN, K. O.; AIYELAAGBE, O. O. The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 3, p. 324–328, 2009.

STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S.; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R.; GARCIAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 3, p. 409-415, 2010.

ZELNIK, R.; MATIDA, A. K.; PANIZZA, S. Chemistry of the Brazilian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans* Pohl. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 42, p. 357-361, 1978/79.

## DISCUSSÃO

A caracterização da viabilidade polínica de *P. longipes*, demonstrou variação de 57,5 a 100% na viabilidade polínica dos 15 acessos analisados e, da mesma forma, foram encontradas diferenças significativas quando comparadas as médias de viabilidade polínica para cada um deles, o que pode ser indicativo de uma possível variabilidade genética na espécie. Neto et al. (2006), ao encontrarem diferenças na viabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), também atribuíram à ocorrência desses dados a possibilidade de variabilidade genética.

No entanto, para *P. longipes*, apenas os acessos 11 (São Vicente do Sul), com o corante carmim acético 2%, e 14 (Rosário do Sul), com os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander, apresentaram viabilidade inferior a 70%. Para os demais acessos foram observados valores acima de 70%, o que segundo Souza et al. (2002) indica alta viabilidade polínica para a espécie.

Diversos autores, ao estimarem a viabilidade polínica de plantas medicinais, também encontraram altas porcentagens de grãos de pólen viáveis, dentre eles Piccinini et al. (2012), que encontraram viabilidade polínica alta para todos os genótipos de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) analisados. Também Martins et al. (2010) observaram valores acima de 90% para acessos de *Capsicum annuum* L. e *Capsicum baccatum* L., e Biondo e Battistin (2001) verificaram viabilidade polínica acima de 90% para cinco espécies do gênero *Rhyncosia* Lour e para cinco das seis espécies de *Eriosema* (DC.) G. Don estudadas.

Quanto aos métodos colorímetros utilizados, quando comparados entre si, verificou-se que a orceína acética 2% superestimou os valores de viabilidade polínica para os acessos de *P. longipes*, indicando 100% de grãos de pólen viáveis para 11 dos 15 acessos, enquanto que para o carmim acético 2% e para o reativo de Alexander foi observada a eficiência desses corantes na distinção de polens viáveis e inviáveis e a eficácia na estimativa da viabilidade polínica dessa espécie.

A eficiência do reativo de Alexander para a distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis já foi comprovada por diversos autores (AULER et al., 2006; TECHIO, 2006; COELHO et al., 2012; FRESCURA et al., 2012; PICCININI et al., 2012), já que o corante possui a vantagem de diferenciar o protoplasma a parede celulósica (ALEXANDER, 1980), o que garante, nitidamente, a visualização da deficiência do protoplasma em grãos de pólen inviáveis (BATTISTIN; MATTOS, 2002). Para os acessos de *P. longipes*, o carmim acético 2% levou a resultados igualmente satisfatórios. O bom desempenho desse corante também foi

observado por Almeida et al. (2006) na estimativa da viabilidade polínica do afavação (*O. officinalis*), e por Vargas (2006) em estudo sobre a viabilidade polínica de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.).

No que diz respeito à análise da genotoxicidade dos extratos aquosos das folhas de *P. longipes* pelo teste de *A. cepa*, verificou-se a atividade antiproliferativa para os extratos dos dois acessos testados, porém esse efeito foi significativamente maior para os extratos do acesso de Tupanciretã, em ambas concentrações estudadas. Além disso, não foi encontrada atividade genotóxica para os extratos do acesso de Tupanciretã. A partir da análise dos compostos fenólicos, obtida através da cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível constatar maior quantidade de ácido rosmarínico e canferol também para os extratos aquosos do acesso de Tupanciretã, o que pode estar relacionado com o efeito antiproliferativo e a ausência de genotoxicidade de seus extratos.

A diferença encontrada na quantidade dos compostos ácido rosmarínico e canferol, para os extratos de plantas coletadas em diferentes municípios, pode ter influência de fatores que atuam sobre a produção de metabólitos secundários. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a altitude, dentre outros fatores, pode agir no processo de produção de metabólitos secundários como os flavonóides. No caso dos municípios de Santa Maria e Tupanciretã, que possuem altitudes de 151m e 400m, respectivamente, apesar da diferença não ser grande, ainda assim a altitude pode ter sido fator atuante nesse processo, agindo individualmente ou em conjunto com outros fatores sobre as plantas coletadas.

Para os extratos do acesso de Santa Maria, além de terem efeito antiproliferativo menor, também demonstraram potencial genotóxico. Além disso, não foi encontrada atividade antigenotóxica para os extratos de *P. longipes* testados após o uso do glifosato.

A atividade antiproliferativa já foi encontrada, através do teste de *A. cepa*, para outros extratos de plantas medicinais, como *Pterocaulon polystachyum* (KNOLL et al., 2006), *Pluchea sagittalis* (ROSSATO et al., 2010) e *Psychotria leiocarpa* (LUBINI et al., 2008) Já o efeito antiproliferativo acompanhado de potencial genotóxico também foi observado para as espécies *P. myriantha* (LUBINI et al., 2008), *Baccharis trimera* (Less) D. C. e *B. articulata* (Lam.) Pers. (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostram variação das médias de grãos de pólen viáveis para os acessos estudados, o que pode ser indicativo de variabilidade genética dentro da espécie *P. longipes*. Dos 15 acessos estudados, 13 apresentam alta viabilidade polínica com valores acima de 75%. Os acessos 11 (São Vicente do Sul), através da observação com o corante carmim acético 2%, e o 14 (Rosário do Sul), de acordo com os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander apresentam baixa viabilidade polínica. Além disso, por meio de comparação entre os métodos colorímetros, verifica-se que a orceína acética 2% superestima a viabilidade polínica, e que o carmim acético 2% e o reativo de Alexander permitem uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis, sendo os dois últimos mais eficientes para a técnica na espécie.

E, em relação à genotoxicidade de *P. longipes*, analisada através do teste de *A. cepa*, pode-se concluir que seus extratos aquosos, preparados com as folhas dos dois acessos estudados, em ambas as concentrações, apresentam potencial antiproliferativo, porém esse efeito é significativamente maior para os extratos do acesso de Tupanciretã. Esse acesso também apresenta maior quantidade de ácido rosmarínico e canferol, o que pode estar relacionado com o efeito antiproliferativo e a ausência de genotoxicidade de seus extratos. Já no que diz respeito aos extratos do acesso de Santa Maria, além de terem efeito antiproliferativo menor, também demonstram potencial genotóxico.

A viabilidade do pólen é um parâmetro importante no estudo das plantas por contribuir para a caracterização de cada espécie, auxiliando em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos e na elaboração de trabalhos de melhoramento genético. Da mesma forma, estudos de genotoxicidade, em especial o teste de *A. cepa*, são uma forma de caracterizar espécies vegetais medicinais ainda pouco conhecidas em relação a seus componentes e atividades de seus extratos, servindo de alerta para a população que se utiliza da medicina popular para o tratamento de doenças.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el Nordeste del Brasil. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, p. 43-64, 1998.

ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology** v.5, n.1, p. 13-18, 1980.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 343 - 353, 2002.

ALMEIDA, O. S. et al. Estimativa da viabilidade polínica em espécies do gênero *Ocimum* com diferentes corantes.. In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. **Anais... Horticultura Brasileira**. Brasília: ABH, v. 24. p. 242-242, 2006.

ARENAS-DE-SOUZA, M. D. et al. Estimativa da viabilidade polínica em indivíduos de *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia chrysotricha* (mart. ex. dc.) standl. (bignoniaceae) através de métodos citoquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 3864-3871, 2014.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.55-63, 2006.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** [online], v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BAGATINI, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista brasileira de farmacognosia** [online], v.19, n.2b, p. 632-636, 2009.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, v. 3. 1991.

BATTISTIN, A.; MATTOS, A. C. F. Número de cromossomos, comportamento meiótico e viabilidade do pólen em três espécies de *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae- Papilionoideae) nativas do sul do Brasil. **Bioikos**, PUC-Campinas, v. 16, n. 1/2, p. 13-17, 2002.

BIONDO, E. ; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhyncosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas da região sul do Brasil. **Bioikos**, PUC-Campinas, v. 15, n. 1, p. 39-44, 2001.

BRIQUET, J. Fragmenta Monographiae Labiaturum I. – **Bulletin de la Société botanique de Genève** 5: 20.122, 1889.

CAMPOS, C. C. F. **Biologia reprodutiva de *Tibouchina heteromalla* Cogn. (Melastomataceae) e *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae)**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado - Ecologia e Conservação de Recursos em Paisagens), Programa de Pós-graduação em Ecologia Aplicada, Universidade Federal de Lavras – MG, 2010.

COELHO, A. P. D. et al. Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). **Agrociencia**, v. 46, p. 481-487, 2012.

CUCHIARA, C. C. et al. Uso de corantes na análise da viabilidade polínica de genótipos de mamoneira expostos em condições adversas. In: Simpósio Estadual de Agroenergia, 2.; Reunião Técnica Anual de Agroenergia, 2., 2008, Porto Alegre. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

DOMINGUEZ-VÁZQUEZ, G. et al. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae em Chiapas. **Anales del Instituto de Biología**, v. 73, n. 1, p. 39-80, 2002.

DONOGHUE, M. J.; ALVERSON, W. S. A new age of discovery. **Annals Missouri Botany Garden**, Saint Louis, v. 97, n. 2, p. 110-126, 2000.

DRASARA, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 3-21, 2004.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.1, 2009.

FAMEI, L. et al. Strategy and chromatographic technology of quality control for traditional chinese medicines. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 24, p. 537-544, 2006.

FERREIRA, A. S. J. Contribuição ao estudo do gênero *Peltodon* Pohl (Labiatae). **Sellowia, Anais Botânicos do Herbário “Barbosa Rodrigues”**, n. 38, 1986.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, p. 159-173, 2007.

FERREIRA, F. G. et al. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** [online], v.19, n.1a, p. 61-67, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Reino Unido, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJO, G. The *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, p. 234-241, 1994.

FRESCURA, V. D. et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v. 36, n. 3, p. 143-145, 2012.

FRESCURA, V. D. et al. Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 755-761, 2013.

FRONZA, M. et al. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 4876–4881, 2011.

FRONZA, M. et al. Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. **Phytochemistry**, v. 78, p. 107–119, 2012.

GOBBO-NETO, L. e LOPES N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora*

(O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.15, n.1, 2013.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, p. 539-542. 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n.1, p. 71–81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, v. 24, p. 471- 486, 1938.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004

LIU, M. et al. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 51-55, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 2008.

LUBINI, G. et al. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v. 63, p. 647-651, 2008.

MARTINS, K. C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.8, p.1746-1751, 2010.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae**. 1994. 94f. Dissertação (Mestrado - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan, 2000. 501 p.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.



NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.4, n.1, p. 67-74, 2006.

PAGLIARINI e POZZOBON. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 2004.

PAULA, J. M. **Caracterização e manejo de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glifosato**. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas. 2009.

PEREIRA, L. P. et al. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** [online], v.36, n.2, p. 678-68, 2006.

PICCININI, F. et al. Pollen viability of *Eragrostis plana* genotypes from different geographic populations in rio grande do sul. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 13-16, 2012.

PIO, L. A. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 147-153, 2007.

RANK, J., NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n. 1, p. 17-24, fev. 1994.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 38-42, 2001.

ROSSATO, L. V. et al. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** [online], v. 82, n. 4, p. 857-860, 2010.

SILVA, C. R. et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [online], v.14, p. 1-2, 2004.

SILVA, A. B. et al. Biologia floral e mecanismos reprodutivos de *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae). **Revista Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 33-40, 2008.

SOUZA, M. M. et al. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 4, p. 373-385, 2004.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa degener*). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

TECHIO, V.H. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*P. Glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353- 362, 2006.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 551-555, dez. 2003.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova** [online], v. 25, n.4, p. 616-623, 2002.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. 2006. 98 f. Dissertação de mestrado. Em fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VICENTINI, V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 593-598, abr/jun. 2001.

ZELNIK, R.; MATIDA, A.K.; PANIZZA, S. Chemistry of the Brazilian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans* Pohl. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42, p. 357-361, 1978/79.