



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



# **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**

**SÉRGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA**

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



**Universidade Federal de Pelotas**  
Campus Universitário s/nº  
Caixa-postal 354 CEP 96010-900  
Pelotas – RS – Brasil

2005

SÉRGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA

**Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos  
Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do  
Rio Grande do Sul**

Monografia apresentada como um dos pré-requisitos ao grau de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Meio Ambiente do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

**ORIENTADOR:**  
**PROF<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA**

Pelotas  
Rio Grande do Sul  
Julho de 2005

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Juraci, que nunca mediu esforço e incentivo para que todos os meus anseios pudessem ser alcançados.

A meu pai Izidoro, a minhas irmãs Catiúscia e Juliana, pelo carinho e dedicação.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Curso de Ciências Biológicas, por ter possibilitado a conclusão do curso e também a realização desse trabalho.

A Professora Dra Beatriz Helena Gomes Rocha, pela ultra paciência, carinho, dedicação e orientação nesse trabalho.

A Professora Dra Vera Lucia Bobrowski, pela amizade, dedicação e principalmente na ajuda de vez em quando nas estatísticas.

A Professora Rita Aloma Pascker Vianna, que foi o elo de ligação para chegada ao laboratório de genética.

A Professora Clause Fátima de Brum Piana e a o Professor João Baptista da Silva, pelo empenho na análise estatística desse trabalho.

A Vanessa Stein, pelo auxílio, ensinamentos da citogenética e pela grande amizade que foi construída nesses quatro anos.

Aos colegas de laboratório, Leticia, Gustavo, Laura, Daiane, João, e Alessandra, que proporcionaram momentos ímpares nesse curto intervalo de tempo.

Aos colegas de aula, Marcia, Miriam e Valeska, pela amizade e carinho ao longo da graduação.

A Marcio Mariot, pela coleta e identificação correta das espécies vegetais.

A Álvaro Martins pelo auxílio na pratica laboratorial

A todos aqueles que de uma forma ou de outra ajudaram na realização e conclusão desse trabalho.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ENSAIOS PARA O MONITORAMENTO DE GENOTOXICIDADE.....	4
2.1.1. Teste de mutação e recombinação somática (SMART).....	5
2.1.2. Teste de troca de cromátides irmãs.....	7
2.1.3. Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em <i>Salmonella typhimurium</i> – teste Salmonella - microssoma.....	8
2.1.4. Teste de mutagênese e recombinogênese em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
2.1.5. Teste de micronúcleos.....	11
2.1.6. Teste de aberrações cromossômicas.....	12
2.2. GERMINAÇÃO.....	14
2.2.1. Pureza das sementes.....	16
2.2.2. Vigor das sementes.....	16
2.2.2.1. Índice de velocidade de germinação (IVG).....	17
2.2.2.2. Primeira contagem.....	18
2.3. FITOQUÍMICOS.....	18
2.4. ALELOPATIA.....	21
2.4.1. Alelopatia na agricultura.....	24
2.4.2. Alelopatia e plantas invasoras.....	25
2.4.3. Alelopatia de plantas lenhosas.....	26
2.5. ESPÉCIES MEDICINAIS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. RECURSOS MATERIAIS.....	36
3.2. MATERIAL BOTÂNICO.....	36
3.3. EXTRATO BRUTO AQUOSO – INFUSÃO (EBA).....	37
3.4. BIOTESTES.....	37
3.5. ÍNDICE MITÓTICO.....	39
3.6. LIMPEZA DAS LÂMINAS.....	40
3.7. COLETA E FIXAÇÃO.....	41
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÕES.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	77

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Inflorescências de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b> Ramo com inflorescências de <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b> Ramo floral de <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Bauhinia candicans</i> Benth. Em estágio fértil.....	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Detalhe dos ramos angulosos de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Detalhe dos ramos de <i>Casearia sylvestris</i> Sw.....	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Folhas e ramos florais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. et. Zucc.....	<b>34</b>
<b>Figura 8.</b> Detalhes da folhas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM em sementes de alface tratadas diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	<b>45</b>
<b>Figura 10.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis Germinação e IM para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	<b>49</b>

<b>Figura 12.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis IVG e IM para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	<b>50</b>
<b>Figura 13.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas, para a variável Índice Mitótico em diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	<b>51</b>
<b>Figura 14.</b> Células meristemáticas de cebola, apresentando micronúcleos, tratadas com extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i> Spreng na concentração de 40mg/mL .....	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para a IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM em sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Bauhinia candicans</i> Benth.....	<b>55</b>
<b>Figura 17.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para a variável IM em sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Bauhinia candicans</i> Benth.....	<b>56</b>

<b>Figura 18.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	<b>58</b>
<b>Figura 19.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para a variável IM em sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	<b>59</b>
<b>Figura 20.</b> Célula meristemáticas de cebola, apresentando ponte anafásica, na concentração de 40mg/mL do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.(400x).....	<b>59</b>
<b>Figura 21.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, IVG e IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Casearia sylvestris</i> Sw...	<b>61</b>
<b>Figura 22.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas, para a variável Índice Mitótico em diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Casearia sylvestris</i> Sw.....	<b>61</b>
<b>Figura 23.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Luehea divaricata</i> Mart. et. Zucc.....	<b>63</b>
<b>Figura 24.</b> Células meristemáticas de alface e cebola tratadas com extrato aquoso de <i>Luehea divaricata</i> Mart. et. Zucc. (40 mg/mL), apresentando cromossomos perdidos (a) e micronúcleo (b) .....	<b>64</b>

<b>Figura 25.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.....	<b>67</b>
<b>Figura 26.</b> Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, IVG e IM para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.....	<b>68</b>
<b>Figura 27.</b> Células meristemáticas de cebola tratadas com extrato aquoso de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.. (40 mg/mL), apresentando pontes anafásicas (a) e micronúcleos (b).....	<b>69</b>



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), relativos à espécie medicinal <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	44
<b>Tabela 2.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação), relativos à espécie medicinal <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	48
<b>Tabela 3.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis IVG e IM. relativos a espécie <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	52
<b>Tabela 4.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, IVG e IM, para a espécie <i>Bauhinia candicans</i> Benth.....	54
<b>Tabela 5.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM. para a espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	57
<b>Tabela 6.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação e IVG, para a espécie <i>Casearia sylvestris</i> Sw.....	60

<b>Tabela 7.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, IVG e IM, para a espécie <i>Luehea divaricata</i> Mart. et. Zucc.....	<b>62</b>
<b>Tabela 8.</b> Médias das observações, por espécie, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG e IM, para a espécie <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.....	<b>68</b>
<b>Tabela A1.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal marcela, <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	<b>78</b>
<b>Tabela A2.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal guaco, <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	<b>78</b>
<b>Tabela A3.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal estévia, <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	<b>79</b>
<b>Tabela A4.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal pata de vaca, <i>Bauhinia candicans</i> Benth.....	<b>79</b>

<b>Tabela A5.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal espinheira santa, <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	<b>80</b>
<b>Tabela A6.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal chá de bugre, <i>Casearia sylvestris</i> Sw.....	<b>80</b>
<b>Tabela A7.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal açoita cavalo, <i>Luehea divaricata</i> Mart. et. Zucc.....	<b>81</b>
<b>Tabela A8.</b> Análise da variação e testes de significância para as variáveis Primeira contagem, Germinação, IVG (Índice de velocidade de germinação) e IM (Índice mitótico), para a espécie medicinal sálvia, <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.....	<b>81</b>

## RESUMO

A utilização de ensaios biológicos vegetais para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido freqüentemente incorporado à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas. Os compostos químicos presentes nos vegetais, são utilizados na medicina popular para a cura de doenças, onde sua preparação e seu uso apropriado trazem muitos benefícios, porém seus efeitos genotóxicos e mutagênicos necessitam de maiores investigações. Esse estudo teve como objetivo utilizar sementes de alface e de cebola como biotestes para avaliar o efeito fitocitotóxico do extrato de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul. Os biotestes foram conduzidos em germinador (20°C), com extrato aquoso obtido por infusão de folhas secas nas concentrações de: 5, 10, 20 e 40 mg/mL e água destilada (controle). Os testes de germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação (IVG), que avaliam efeito alelopático, foram feitos com quatro repetições de 100 sementes/concentração/bioteste. Para determinação da citotoxicidade, através do índice mitótico (IM), foram contadas, pela técnica de varredura, 2000 células/concentração/bioteste. Foram realizadas contagens diárias para o índice de velocidade de germinação (IVG), para o teste de primeira contagem aos quatro dias para a alface e aos seis dias para a cebola e para o teste de germinação ou germinabilidade aos sete dias para alface e ao 12<sup>o</sup> para a cebola, segundo as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992). As sementes de alface e cebola são ótimos organismos para biotestes, pois são sensíveis a alterações externas, as sementes de alface se demonstraram mais sensíveis ao efeito alelopático

dos extratos aquosos das espécies analisadas, as sementes de cebola podem ser utilizadas como biotestes para monitorar o efeito de compostos derivados de cumarinas, taninos e terpenos, substâncias essas presente em grande quantidade em guaco, espinhiera santa, açoita cavalo e sálvia, respectivamente.

## 1. INTRODUÇÃO

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas tanto ao nível celular quanto molecular. Essas lesões podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos que são prejudiciais às células, uma vez que afeta processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. As alterações podem também causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômeno esse que podem levar a processos cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético e potencialmente gerarem tumores em seres humanos, esses agentes são normalmente conhecidos como genotóxicos (COSTA e MENK, 2000).

A utilização de ensaios biológicos para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos químicos isolados tem sido freqüentemente incorporada

à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como *Food and Drug Administration*, em 1993, e *Organization for Economic Cooperation and Development*, em 1987, têm favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais em laboratórios (HUGGET *et al.*, 1996).

De acordo com Silva *et al.* (2003), a maioria dos biotestes busca agentes que possam afetar aos níveis fisiológico e molecular do organismo exposto e devido a universalidade do código genético, se o agente causar danos ao DNA, ele têm potencial genotóxico em qualquer tipo de células (animal, vegetal ou de microrganismos). Ainda segundo o mesmo autor, vários modelos foram propostos por diversos pesquisadores, órgãos de pesquisa e agências governamentais, e a seleção de testes a serem incluídos no modelo é de fundamental importância para o sucesso do mesmo, pois, neste contexto, cada vez mais são necessários novos testes para serem enquadrados nas estratégias de avaliação de risco que atendam às necessidades da vida contemporânea.

A utilização de plantas medicinais nativas no tratamento de enfermidades é uma prática exploratória e largamente difundida no País. A maioria das espécies tem sido utilizada de forma extrativista e o crescimento da população humana e a ocupação de áreas naturais vêm aumentando a pressão destrutiva sobre esta flora (ROSA e FERREIRA, 2001). De acordo com Rosa (2000), o progresso da fitoterapia e a obtenção de fitofármacos dependem do acesso facilitado a plantas produtoras e a inúmeras substâncias ativas que estão presentes.

A importância das plantas medicinais deve-se a sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas (YUNES *et al.*, 2001). No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO *et al.*, 2000).

Segundo Nunes e Araújo (2003), a utilização de plantas na medicina popular é uma prática realizada há séculos para a cura de doenças, onde sua preparação e seu uso apropriado trazem muitos benefícios, porém, seus efeitos fisiológicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo humano necessitam de maiores investigações.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de biotestes, sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e de cebola (*Allium cepa* L.), no monitoramento do efeito fitocitotóxico de oito espécies medicinais nativas do Rio Grande do Sul, através do teste de primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM).



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Ensaio para o monitoramento de genotoxicidade**

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

Um bioindicador e um biomonitor podem ser mais valiosos se detectarem os agentes poluentes ou tóxicos em mais de um ambiente (aquático, terrestre e atmosférico). Além disso, devem permitir a detecção de muitas classes de danos em diversos tipos de células. Muitos organismos são utilizados como bioindicadores por avaliarem possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos, organismos bentônicos, anfíbios e peixes têm sido utilizados para o monitoramento de toxicidade de poluentes. Vegetais, como *Tradescantia sp*, *Allium cepa* e *Vicia faba*, têm sido empregados na avaliação de agentes potencialmente citotóxicos presentes tanto na água quanto na atmosfera (SILVA *et al.*, 2003). Ainda segundo os mesmos autores, muitas vezes espécies selvagens são utilizadas como bioindicadores de risco ecológico, enquanto que animais domésticos são mais úteis para a avaliação do risco a saúde humana, servindo todos esses como excelentes bioensaios.

A verificação da citotoxicidade e da genotoxicidade de substâncias é avaliada por uma gama de bioensaios que são considerados mais ou menos sensíveis, expressando, assim, resultados satisfatórios conforme o agente a que são expostos (SILVA *et al.*, 2003).

### **2.1.1. Teste de mutação e recombinação somática (SMART)**

Mutação e recombinação mitótica são mecanismos importantes que levam a perda da heterozigidade. Estudos sobre os eventos genéticos relacionados com o desenvolvimento de tumores, tais como, retinoblastoma, tumores de Wilm e outros,

demonstram a importância da perda da heteroziguidade. Nestas doenças, a condição pré-existente de heteroziguidade é perdida por eventos genéticos que podem levar a células filhas homocigotas. Por esta razão, é essencial um teste de genotoxicidade sensível e capaz de detectar, simultaneamente, as mutações, assim como rearranjo e recombinação mitótica (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

O teste de SMART (*Somatic mutation and recombination test*), desenvolvido por Becker (1976) e aprimorado por Vogel (1987), detecta a perda de heteroziguidade de genes marcadores que determinam fenótipos identificados nas asas de *Drosophila melanogaster*. É um método que utiliza células somáticas e pode ser feito em uma só geração, aproximadamente em 10 dias. Além disso, pode ser utilizado para um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas e também partículas gasosas (SILVA *et al.*, 2003).

O teste da mancha da asa (SMART) baseia-se em grupos de células, discos imaginários, que proliferam separadamente durante o desenvolvimento até diferenciarem-se, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Uma vantagem desse método é possibilitar a exposição de uma grande população de células dividindo-se mitoticamente no disco imaginal da larva. Dessa maneira, se uma alteração genética ocorre em uma célula do disco imaginal, esta poderá ser representada em todas as células descendentes e formar um clone de células mutantes, que pode ser detectado como uma mancha na superfície do corpo da mosca (FREI e WÜRGLER, 1995).

De acordo com Silva *et al.* (2003), o tamanho da mancha está relacionado com o tempo de atuação da genotoxina ao longo da embriogênese, indicando o momento da

indução do dano. Aumentos restritos a manchas simples pequenas podem indicar aneugênese ou clastogênese.

### **2.1.2. Teste de troca de cromátides irmãs**

Durante a divisão celular, segmentos de DNA resultantes da replicação trocam de lugar, simetricamente. A esses eventos de translocação recíproca, que ocorrem no mesmo loco, entre as cromátides irmãs de um cromossomo, são denominadas SCEs (Sister Chromatid Exchange). A análise de frequência de trocas entre cromátides-irmãs é uma metodologia citogenética bastante sensível em estudos genotóxicos. Este processo de permuta é considerado indicador da ocorrência de possíveis lesões e reparação da molécula de DNA em células de mamíferos, pois quanto mais o número de permutas aumenta, também aumenta o número de possibilidade de erros nas reuniões das cadeias de DNA. A proporção entre a indução de SCE e de mutação ou aberração cromossômica é diferente para cada agente químico testado. Os agentes testados mostram diferentes eficiências de indução e cada tipo de lesão formada parece ser processada diferentemente pela célula, resultando em um tipo específico de dano. A correlação com outros tipos de danos no DNA cromossômico é bastante elevada, havendo, no entanto, substâncias ou processos onde esta correlação não foi detectada. A indução de SCEs pode ser feita tanto *in vitro* como *in vivo* em quaisquer organismos onde seja possível fazer cultura de células. No cultivo celular, adicionam-se os marcadores que irão corar as cromátides-irmãs diferentemente, evidenciando as

trocas quando ocorrem. Os ensaios de SCEs são muito sensíveis, mas trabalhosos; contudo, não podem ser considerados testes de mutagênese, mas apenas indicativo, pois as trocas de cromátides-irmãs não resultam necessariamente em mutação (SILVA *et al.*, 2003).

### **2.1.3. Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – teste *Salmonella* - microssoma**

O teste de Ames foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na década de 70. Tem sido utilizado, mundialmente, nas últimas décadas para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas puras e misturas complexas (HENRIQUES *et al.*, 1987; ROLLA, 1995)

A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresenta características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações, incluindo seqüências sítio-específicas no DNA que respondem positivamente para reversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídios contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro. A especificidade das linhagens fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. Existem bancos de dados disponíveis contendo resultados do teste com *Salmonella* para uma grande variedade de compostos químicos, medicamentos e misturas complexas (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Este teste de mutação gênica utiliza células procarióticas, as quais diferem das células de mamíferos em fatores como permeabilidade, metabolismo, estrutura dos cromossomos e processo de reparo do DNA. Os testes são realizados *in vitro*,

acrescidos de uma fonte exógena de metabolização visando mimetizar parcialmente as condições de metabolização de mamíferos. O teste não fornece informação direta sobre a potência mutagênica em mamíferos, apesar da alta concordância dos resultados com o teste de Ames e ensaios de carcinogenicidade com roedores (RABELO-GAY *et al*, 1991).

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. Tais linhagens são construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Essas linhagens não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste, na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada (HENRIQUES *et al.*, 1987).

#### **2.1.4. Teste de mutagênese e recombinogênese em *Saccharomyces cerevisiae***

Esse teste tem por objetivo avaliar agentes químicos e sua atividade mutagênica, utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae*, que é um fungo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico e completo. Os efeitos genéticos de mutagênicos

podem ser avaliados em culturas haplóides e diplóides e em todos os estágios do ciclo celular como G1, síntese de DNA, mitose e meiose, assim como os elementos genéticos extracelulares, como as mitocôndrias. A recombinação mitótica em células diplóides pode ser reflexo da expressão das atividades de reparação celular em resposta aos danos introduzidos no genoma pelos agentes químicos. Substâncias que produzem mutações freqüentemente podem introduzir efeitos recombinantes (SILVA *et al.*, 2003).

O ensaio de conversão gênica mitótica na levedura mede a conversão de alelos inativos diferenciais para cada alelo do tipo selvagem pela ação de agentes mutagênicos. A linhagem da levedura diplóide heterozigota tem dois alelos inativos diferentes no mesmo locus gênico. A presença desses alelos causa uma dependência nutricional, isto é, essas células crescem somente em meio suplementado com nutriente específico. Quando ocorre a conversão do gene, um fenótipo do tipo selvagem muito ativo é produzido a partir desses alelos inativos através da recombinação intragênica. Para avaliar a indução de permutação mitótica, as linhagens de leveduras diplóides heterozigotas apresentam um par de marcadores recessivos, distantes entre si, mas localizados no mesmo braço cromossômico em diferentes homólogos e frente aos alelos selvagens correspondentes. O crossing-over resulta no posicionamento de ambos os alelos recessivos no mesmo cromossomo homólogo, enquanto que os alelos selvagens localizam-se no outro cromossomo homólogo (HENRIQUES *et al.*, 1987).

A levedura possui também um sistema endógeno de ativação metabólica, constituído pelo complexo enzimático citocromo p-450, o qual a torna capaz de ativar vários pré-mutagênicos sem necessidade de ativação de um sistema exógeno (SILVA *et al.*, 2003).

### **2.1.5. Teste de micronúcleos**

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não ser unido ao fuso), este também pode ser considerado um micronúcleo. Os micronúcleos então são, estruturalmente, pequenos núcleos representados por material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. Este dano pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). O teste de micronúcleo, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese e danos ao fuso mitótico (SILVA *et al.*, 2003).

O teste de MN em organismo sob exposição aguda, menos de quatro semanas, é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófitos (EPC) que por conterem RNA ribossomal se cora de forma diferenciada. Enquanto que na exposição crônica, os MN são avaliados tanto em EPC, como em eritrócitos maduros (ENC). A análise por ser muito simples apresenta vantagem em relação a análise dos cromossomos. Os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula.



Pode-se avaliar micronúcleos para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da mucosa bucal, do trato urinário, e também monitorar ambientes através de teste em roedores, plantas e peixes (SILVA *et al.*, 2003).

Em relação aos testes *in vivo*, os produtos a serem testados devem ser diluídos, preferencialmente, em água, pois é um solvente não tóxico.

#### **2.1.6. Teste de aberrações cromossômicas**

A análise de aberrações cromossômicas é um teste de mutagenicidade para a detecção de alterações estruturais. É um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para avaliar os efeitos danosos que os mutagênicos podem causar, é necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, pois dessa forma é possível analisar as etapas da divisão celular, com o objetivo de identificar os efeitos tóxicos e alterações cromossômicas ao longo do processo de divisão celular. Este teste é realizado em células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola), *Vicia faba* e *Tradescantia*. Tem sido amplamente empregado e é usado rotineiramente para avaliar o potencial mutagênico de amostras ambientais (SILVA *et al.*, 2003).

#### **2.1.7. Teste cometa**

O teste cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes,

intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em vegetais, demonstrando a grande sensibilidade e rapidez dos resultados em estudos de genotoxicidade (SILVA *et al.*, 2003).

A metodologia do teste consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células submetidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes afim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado: versão neutra, que detecta quebras duplas nas moléculas de DNA, e versão alcalina, que detecta quebras de fita única e dupla. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento de estruturas secundárias e terciárias presente no núcleo. Imediatamente ao processo de desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica (RIBEIRO, *et al.*, 2003).

O teste cometa é simples e rápido, pode ser executado em qualquer eucarioto, mas como qualquer teste, possui as suas limitações. Não é um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado; por ser muito sensível deve-se ter cautela, além de um bom controle para análise das conclusões; e o tempo decorrido entre a exposição ao mutagênico e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto, em média 24 horas, pois o reparo começa imediatamente (SILVA *et al.*, 2003).

## 2.2. Germinação

A germinação é uma seqüência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes; cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais. A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado pelos botânicos como a retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula (FERREIRA e BORGHETTI, 2004). Em síntese, tendo-se uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas uma série de condições externas (do ambiente) e internas (intrínsecas do indivíduo), ocorrerá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à germinação. Por isso, do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

Dentre os principais fatores que afetam a germinação pode-se citar: a luz, a temperatura, a disponibilidade de água e o oxigênio. Referente à sensibilidade luminosa, existe uma ampla variação nas respostas germinativas. No início do século XX, foi descoberto que a germinação de algumas espécies era inibida pela luz, enquanto que em outras a germinação era promovida (RAVEN, *et al.*, 2001).

Algumas sementes germinam somente com extensa exposição à luz e outras com breve exposição, apesar de muitas se apresentarem indiferentes à luminosidade. Certas sementes germinam somente no escuro e outras necessitam de um longo ou curto fotoperíodo diário. A germinação não está apenas relacionada com a presença ou ausência de luz, mas também com a qualidade de luz. A qualidade de luz durante a

maturação da semente é um importante fator controlador da germinação. Em geral, os fatores luz e temperatura não têm ação independente sobre a germinação de sementes (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

Assim, a temperatura exerce um importante papel na germinação de sementes fotossensíveis (sensíveis à luz). Com relação à temperatura, esta pode afetar as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo. As sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos de temperatura, variável de espécie para espécie, que caracterizam sua distribuição geográfica. No estudo dessa dependência, é de grande interesse ecofisiológico a determinação das temperaturas mínima, ótima e máxima. A temperatura ótima pode ser aquela em que a maior germinação é alcançada no menor tempo. As temperaturas extremas (abaixo e acima da temperatura ótima) são aquelas onde as sementes não conseguem germinar mais. Há espécies que respondem bem tanto à temperatura constante como à alternada. A alternância de temperatura corresponde, provavelmente, a uma adaptação às flutuações naturais do ambiente (POPINIGIS, 1977).

Entre os fatores do ambiente, a água é o fator que mais influência o processo de germinação. Com a absorção de água, por embebição, ocorre a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

Por outro lado, o excesso de umidade, em geral, provoca decréscimo na germinação, visto que impede a penetração do oxigênio e reduz todo o processo metabólico resultante. A velocidade de absorção de água varia com a espécie, com o

número de poros distribuídos sobre a superfície do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área e contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e qualidade fisiológica da semente. O movimento da água para o interior da semente é devido tanto ao processo de capilaridade quanto de difusão e ocorre no sentido do maior para o menor potencial hídrico. Assim sendo, a embebição é essencialmente um processo físico relacionado às características de permeabilidade do tegumento e das propriedades dos colóides que constituem as sementes, cuja hidratação é uma de suas primeiras conseqüências (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

### **2.2.1. Pureza das sementes**

É de extrema importância avaliar a pureza das sementes. Sementes puras apresentam alta qualidade física e genética. A pureza física implica na ausência de impurezas tais como: palhas, folhas, sementes de plantas daninhas, sementes de outras culturas, etc. A pureza genética implica que o lote de sementes contenha apenas sementes com características conhecidas da variedade ou cultivar em análise (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

### **2.2.2. Vigor das sementes**

Segundo a *International Seed Testing Association* (1992), o vigor de sementes é a soma das propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho

de uma semente ou de um lote de sementes durante a germinação e a emergência da plântula.

Os teste de vigor também podem ser expandidos para a avaliação de plântulas, sendo realizados em laboratórios em condições controladas ou em condições de campo (VIEIRA e CARVALHO, 1994). Os testes em laboratório devem seguir as metodologias dos testes padrão de germinação, ou seja, seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Já os testes em campo são conduzidos em condições naturais de ambiente, de preferência em época recomendada para a semeadura da espécie em avaliação, pois, assim obtém-se resultados diretamente aproveitáveis para a implantação de cultura ou tem-se um bom indicativo para a potencialidade dos lotes em sua fase inicial de desenvolvimento em campo (FERREIRA e AQUILA, 2000).

#### **2.2.2.1. Índice de velocidade de germinação (IVG)**

A velocidade germinação é um dos conceitos mais antigos de vigor de sementes (AOSA, 1983). Lotes de sementes com percentagens de germinação semelhantes, freqüentemente mostram diferenças em suas velocidades de germinação, indicando que existem diferenças de vigor entre elas (VIEIRA e CARVALHO, 1994). Segundo os mesmos autores, as avaliações das plântulas, são realizadas diariamente a mesma hora, a partir do dia em que surgem as primeiras normais. Essas plântulas normais são computadas e retiradas do substrato, para evitar alterações no desenvolvimento de outras plântulas. O procedimento descrito de avaliação prossegue até o dia da última contagem estabelecido pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Ao fim

do teste, com os dados diários do número de plântulas normais, calcula-se a velocidade de germinação. Pelo IVG, quanto maior o valor obtido, subentende-se maior velocidade de germinação a maior vigor, pois o índice calculado estima o número médio de plântulas germinadas por dia (VIEIRA E CARVALHO, 1994).

#### **2.2.2.2. Primeira contagem**

O teste de primeira contagem baseia-se no princípio de que as amostras que apresentam maior percentagem de germinação de plântulas normais na primeira contagem, estabelecida pelas Regras Para Análises de Sementes (BRASIL, 1992). No teste de germinação são as mais vigorosas. Este teste pode, muitas vezes, expressar melhor as diferenças de germinação entre lotes do que os índices de velocidade de germinação (VIEIRA E CARVALHO, 1994).

### **2.3. Fitoquímicos**

Considerando o metabolismo secundário, os vegetais produzem uma gama de substâncias que, além de desempenharem funções fisiológicas, resultam em interações entre plantas, causando impactos no ambiente adjacente. Estas substâncias químicas são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (SILVA, 2004).

De acordo com RICE (1984), as substâncias químicas identificadas como agentes alelopáticos se enquadram em quatorze categorias: (1) ácidos orgânicos

solúveis em água, álcoois de cadeia curta, aldeídos alifáticos e cetonas, (2) lactonas simples insaturadas, (3) ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos, (4) naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, (5) fenóis simples, ácido benzóico, e derivados, (6) ácido cianâmico e derivados, (7) cumarinas, (8) flavonóides, (9) taninos, (10) terpenóides e esteróides, (11) aminoácidos e polipeptídeos, (12) alcalóides e cianohidrininas, (13) derivados sulfurados e glicosídeos de óleo mostarda, e (14) purinas e nucleosídeos. Além dessas categorias, o autor também destaca mais uma miscelânea de fitoquímicos que não se enquadram claramente em nenhuma das divisões acima, apesar de apresentarem relações com uma ou mais categorias.

Os exemplos de substâncias aleloquímicas são inúmeras na bibliografia, dessa forma alguns desses merecem uma melhor atenção.

Saponinas são triterpenóides glicosilados que também estão envolvidos na alelopatia. A cadeia polissacarídica hidrofílica e o esteróide hidrofóbico conferem a estas substâncias propriedades de detergentes e, conseqüentemente, a capacidade de ligação a membranas celulares, afetando o funcionamento celular. São conhecidas por suas propriedades hemolíticas e toxidez para moluscos, insetos e fungos (RIZVI *et al.*, 1992).

RIZVI *et al.* (1992), identificaram três saponinas, presentes nas folhas de *Duranta repens* com efeitos potencialmente alelopáticos. Nesse estudo, foi constatada uma inibição no crescimento radicular de plântulas de *Brassica juncea* por estas substâncias.

Os flavonóides estão presentes nas plantas em diversas formas e com variadas funções. Incluem flavonóides, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, proantocianinas, isoflavonóides, entre outros. Além das funções de pigmentos, atrativos



ou repelentes de herbívoros, proteção contra radiação UV, estas substâncias apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (RICE, 1984). O mesmo autor cita alguns casos em que foram evidenciados efeitos fitotóxicos de flavonas, entretanto, o autor afirma que poucos estão envolvidos em alelopatia.

Os taninos possuem a capacidade de se ligar a proteínas, geralmente de forma irreversível, formando precipitados. O papel defensivo dessas moléculas, contra ataque de herbívoros invertebrados e vertebrados, reside nesta característica, apresentando, conseqüentemente, sabor adstringente e difícil digestão, já que as enzimas digestivas não conseguem atacar esses precipitados.

As proantocianinas, também conhecidas como taninos condensados, são polímeros de flavonóides (catequina e flavan-3,4-dióis). Essa classe de taninos é encontrada em todas as plantas lenhosas, ao contrário dos taninos hidrossolúveis que são restritos a poucas famílias das angiospermas, estando ausentes nas monocotiledôneas. Os taninos hidrossolúveis são ésteres de ácidos fenólicos, geralmente o gálico, e açúcares, apresentando uma sensibilidade à hidrólise por ácidos diluídos (RICE, 1984).

Os terpenóides são geralmente insolúveis em água e são encontrados em resinas, ceras, látex e óleos essenciais; as plantas produzem uma grande variedade dessas substâncias, que atuam como reguladores de crescimento, filoalexinas e repelentes para insetos herbívoros (RICE, 1984).

Os derivados fenólicos são estruturas com anel aromático e grupos hidroxila, tendo em sua maioria, origem a partir da fenilalanina. Estas substâncias atuam na defesa contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores, na proteção contra

a radiação ultravioleta e no estabelecimento de simbiose. Os fenólicos compreendem ao maior grupo de metabólicos que foram identificados como alelopáticos (RICE, 1984).

Os alcalóides englobam mais de 12.000 estruturas já descritas, ficando atrás apenas dos terpenóides. Aproximadamente 20% das espécies vegetais acumulam alcalóides, moléculas caracterizadas pelo baixo peso molecular e pela origem a partir de fenilalanina, tirosina, triptofano e lisina. De acordo com RICE (1984), vários alcalóides são capazes de inibir o crescimento de bactérias, além de serem tóxicos para alguns invertebrados.

#### **2.4. Alelopatia**

Considerando o metabolismo secundário, os vegetais produzem uma gama de substâncias que, além de desempenharem funções fisiológicas, resultam em interações entre plantas, causando impactos no ambiente adjacente. Estas substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (FERREIRA e AQUILA, 2000)

As interações químicas são diversas e complexas e conferem as plantas doadoras e aquelas que produzem e liberam metabólitos bioativos. A alelopatia é um tipo de interação bioquímica entre vegetais, que tem sido amplamente estudado nos últimos anos, devido a sua importância em diversos ecossistemas. Esse fenômeno pode ser considerado uma adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitos vegetais (MEDEIROS, 1990).

O conceito de alelopatia sugere que biomoléculas produzidas por uma planta alcancem o meio ambiente e influenciem o crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas (RIZVI *et al.*, 1992). O termo alelopatia foi cunhado por Molisch (1937) e significa do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer. O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias gasosas volatilizadas no ar que cerca as plantas terrestres. Rice (1984) definiu alelopatia como: qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente.

No entanto, a maioria das pesquisas em alelopatia refere-se ao efeito aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, não considerando os efeitos celulares relacionados às mudanças fisiológicas do bioensaio (PRATES *et al.*, 2001).

Rice (1984) relata que os aleloquímicos podem ser encontrados em todas as partes dos vegetais: caule, folhas, raízes, inflorescências e flores, frutos e sementes. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos tem empregado folhas como principal fonte dessas substâncias.

Segundo Chou e Kuo (1986), existem diversas rotas de liberação dessas substâncias para o ambiente, incluindo-se a volatilização pelas partes aéreas da plantas, lixiviação das superfícies do vegetal através da chuva, orvalho e neblina, a exsudação pelas raízes, a decomposição de resíduos vegetais e lixívia de serrapilheira. A decomposição de resíduos destaca-se como a fonte de aleloquímicos mais

importante, entretanto, esse processo de liberação não é uniforme, variando conforme o ecossistema.

Os efeitos que podem ser ocasionados pelos aleloquímicos sobre uma planta são diversos, pois é muito difícil separar os efeitos secundários das causas primárias (RICE, 1984). Os efeitos visíveis, observados em muitos estudos de alelopatia, são, portanto, sinais secundários de mudanças ocorridas num nível molecular (MEDEIROS, 1990).

Basicamente, os aleloquímicos podem apresentar mecanismos de ação diretos ou indiretos sobre a planta alvo. Os efeitos indiretos incluem alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e, também, nas populações ou atividades de organismos. Já os efeitos diretos, que são mais estudados, incluem alterações no crescimento e no metabolismo vegetal. Compreendem alterações ao nível celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, bem como, modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas, entre outras (RICE, 1984, RIZVI *et al.*, 1992).

Os estudos com alelopatia possuem inúmeras dificuldades. Tentando minimizar algumas delas, alguns autores utilizam como bioensaios sementes nativas; mas sementes de espécies cultivadas também são utilizadas, entre elas, as de alface e cebola.

A principal vantagem do uso de *Lactuca sativa* como alvo nos estudos alelopáticos reside na sensibilidade da espécie, mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos. Além disso, a espécie apresenta outras peculiaridades que favorecem sua utilização: germinação rápida, em aproximadamente 24h; crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação; insensibilidade aos

potenciais osmóticos (RICE, 1984). Cattelan *et al.* (2005) e Souza *et al.* (2005), utilizaram sementes de cebola para avaliar o efeito alelopático e citotóxico de extratos aquosos de plantas medicinais, devido a inúmeros estudos citogenéticos realizaddos com a espécie e a sua visualização cromossômica.

#### **2.4.1. Alelopatia na agricultura**

A prática de rotação de cultivos, em agricultura, é bastante difundida no Brasil e em demais países do mundo. Assim, numa época do ano é plantada uma cultura, na seguinte, outra, de maneira que haja um rodízio de culturas. Isto visa não esgotar de forma precoce uma área cultivando uma mesma espécie, porque os requerimentos nutritivos explorados do solo seriam os mesmos, cultivo a cultivo. A repetição dos mesmos cultivos também facilita a instalação e continuidade de fitopatógenos no solo. Por outro lado, este procedimento, muito recomendada, pode ter uma limitação proveniente da incorporação de restos da cultura anterior no solo, onde podem desempenhar uma função alelopática devido aos compostos químicos liberados. Dependendo da cultura na rotação, os efeitos podem ser bastante danosos, com diminuição acentuada de crescimento e produtividade (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários, que variam em qualidade e quantidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles tem sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes às quais as plantas estão expostas. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como

aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como, por exemplo, *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicum esculentum* (tomate), por isso mesmo muito usadas em biotestes de laboratório (FERREIRA e AQUILA, 2000).

#### **2.4.2. Alelopatia e plantas invasoras**

A substituição da vegetação espontânea por uma cultura é bastante comum no Brasil, pois há o costume de pousio sobre áreas agricultoras em várias regiões do país. Nestas áreas já cultivadas e deixadas em repouso, instala-se uma flora espontânea, onde aparecem várias plantas que podem contribuir para que o fenômeno de alelopatia se manifeste. Há na literatura um grande número de exemplos de influência alelopática sobre plantas de culturas ou forrageiras, porém as invasoras de cada local e aquelas de países estrangeiros de outras latitudes não serão comentadas (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Estudos com *Eragrostis plana* (capim-anoni), uma invasora de pastagens de azevém (*Lolium multiflorum* Lam), cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e trevo-branco (*Trifolium repens* L.), verificaram a influência dessa espécie sobre a germinação e desenvolvimento destas forragens (COELHO, 1986). O mesmo autor, explica que sua agressividade como invasora, pelo menos em parte, é devido a substâncias alelopáticas.

Para verificar efeitos alelopáticos, os testes de germinação, em geral, são menos sensíveis do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, massa ou comprimento da radícula ou parte aérea. Ainda assim, foi

demonstrado que extratos da planta de cerrado *Calea cuneifolia* DC. (COUTINHO e HASHIMOTO, 1971) e o extrato de *Wedelia paludosa* DC. (mal-me-quer) inibiam a germinação de tomate, enquanto extratos de ervilhaca (*Vicia sativa*) inibiam a germinação e o crescimento das raízes de alface (MEDEIROS e LUCCHESI, 1993).

Castro *et al.* (1983) observaram que extratos aquosos da parte subterrânea de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (grama-seda), *Cyperus rotundus* L. (tiririca) e *Sorghum halepense* (L.) Pers. (capim massambará) inibiram a germinação e o crescimento do tomateiro. Em arroz o efeito foi apenas sobre o desenvolvimento da plântula (CASTRO *et al.*, 1984).

### **2.4.3. Alelopatia de plantas lenhosas**

Segundo Ferreira e Aquila (2000), pelo fato da maioria das lenhosas serem perenes, estando, portanto, expostas às vicissitudes do ambiente por longos períodos, incluindo, entre estes, o ataque de patógenos e predadores, favorecem o desenvolvimento de metabólitos secundários que as protegem contra a maioria desses ataques.

O cafeeiro é uma típica planta com um grande arsenal químico, no qual a xantina cafeína é a principal substância. Muitas xantinas são poderosas inibidoras do crescimento e podem acumular-se no solo junto aos cafeeiros, sendo inclusive fitotóxicas a radículas de plantas jovens da própria espécie (WALLER *et al.*, 1986). Estes mesmos autores demonstraram que a cafeína é importante fonte de nitrogênio, mobilizada pela semente do cafeeiro na germinação. Esta substância, como outras xantinas associadas, são poderosos aleloquímicos naturais, que controlam o

desenvolvimento de invasoras dos cafezais (ANAYA *et al.*, 1982). Compostos fenólicos ou seus derivados, como o estilbeno e taninos presentes na casca de *Picea engelmannii* Parry, podem inibir o desenvolvimento de várias outras coníferas (TAYLOR e SHAW, 1983). Em plantios mistos de *Juglans nigra* e *Alnus glutinosa* foi encontrado que, após oito anos, todas as plantas da segunda espécie morreram, começando pelos ramos pequenos, depois pelos galhos, tendo sido determinado a causa morte como proveniente de aleloquímicos produzidos pela primeira espécie e que se acumulavam na serrapilheira (RIETVELD *et al.*, 1983). Efeito semelhante foi encontrado quando da presença de *Kalmia angustifolia* L., um arbusto nativo na América do Norte, impedindo o estabelecimento de mudas de *Picea maritima* num programa de reflorestamento (MALLIK, 1992). O gênero *Eucalyptus*, introduzido da Austrália, mas muito cultivado no Brasil, tem várias espécies consideradas alelopáticas, pelo menos em potencial.

## **2.5. Espécies medicinais**

A utilização de plantas medicinais nativas no tratamento de enfermidades é uma prática exploratória e largamente difundida no País. A maioria das espécies tem sido utilizada de forma extrativista e o crescimento da população humana e a ocupação de áreas naturais vem aumentando a pressão destrutiva sobre esta flora (ROSA e FERREIRA, 2001).

De acordo com Rosa (2000), o progresso da fitoterapia e a obtenção de fitofármacos dependem do acesso facilitado a plantas produtoras e substâncias ativas,



mas tendo cautela na utilização desses fitoquímicos, pois muitos deles necessitam de estudos mais detalhados sobre seus efeitos.

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Figura 1), conhecida como marcela, é uma planta herbácea perene, com inúmeras ramificações, com folhas simples, encontrada nativa em campos da campanha gaúcha e também até o norte do estado do Paraná (LORENZI, 2002).



**Figura 1** –*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela), modificado de Lorenzi, 2002

Na medicina caseira seu uso é atribuído para o tratamento de problemas gástricos, epilepsia, e cólicas de origem nervosa, e também muitas vezes, empregado como antiinflamatório, analgésico e contra a diarreia (LORENZI, 2002).

As análises químicas dessa planta mostraram que ela é rica em flavonóides e monoterpenos, sendo muitas dessas substâncias responsáveis pelas suas propriedades ativas (MARTINS *et al*, 2000). Simões (1988), demonstrou que em estudos *in vitro* com ratos Wistar, reduziu o desenvolvimento de células cancerosas, quando essas cobaias foram tratadas com extratos das inflorescências de marcela.

*Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) (Figura 2), conhecida popularmente como guaco, é uma trepadeira sublenhosa, perene com folhas obtusas, encontrada nativa em toda a região sul do Brasil. Segundo Lorenzi (2002), esta planta é utilizada na medicina tradicional, onde se atribui às suas folhas as seguintes propriedades: ação tônica, depurativa, febrífuga, peitoral e antigripal.



**Figura 2** –*Mikania glomerata* Spreng (guaco), modificado de Backes e Irgang 2003.

MARTINS *et al*, (1998). verificaram que apenas a propriedade de ação sobre as vias respiratórias, justificada pelo efeito broncodilatador, expectorante e antiedematoso, foi confirmada. Sua análise fitoquímica comprovou a presença de cumarinas e outras substâncias dela derivadas (SIMÕES, 1986).

*Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae) (Figura 3), planta herbácea perene, nativa em toda a região sul do Brasil, e também encontrada ao longo da fronteira com o Paraguai, teve suas folhas utilizadas como adoçante durante séculos pelos índios guaranis (LORENZI, 2002). Segundo Lorenzi (2002), análises fitoquímicas de estévia mostram que o composto presente em grandes quantidades nas folhas é o esteviosídeo

(5 a 10 %), e que este tem um poder adoçante cerca de 300 vezes maior que o da sacarose, representando cerca de até 18% da folha; por não ser calórico, desperta um grande interesse para fins alimentícios, dietéticos e medicinais. Na medicina popular a planta é considerada hipoglicemiante, diurética e hipo-tensora, sendo usado com sucesso como adoçante mais apropriado para pessoas diabéticas.



**Figura 3** –*Stevia rebaudiana* Bert. (estévia), modificado de Lorenzi, 2002.

*Bauhinia candicans* Benth. (Caesalpiniaceae) (Figura 4), uma das cerca de 300 espécies do gênero *Bauhinia*, apresenta-se como uma árvore de porte arbóreo semidecídua, encontrada do norte da região Sudeste ao sul do Rio Grande do Sul, possuindo folhas uncinadas com formato semelhante a uma pata-de-vaca, designando assim o seu nome popular (MARTINS *et al.* 1998).

A infusão das folhas de *Bauhinia candicans* é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (LORENZI, 2002). De acordo com Silva e Cechinel-Filho (2002), em estudos para isolamentos dos compostos químicos do gênero *Bauhinia*, os efeitos farmacológicos de *B. candicans* estão relacionados

diretamente à presença de grande quantidade de esteróides, flavonóides, alcalóides, álcoois e poliálcoois.



**Figura 4** - *Bauhinia candicans* Benth. (pata-de-vaca), modificado de Backes e Irgang, 2003.

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae) (Figura 5), conhecida como espinheira santa em alusão às suas folhas que possuem bordas espinhosas. É uma espécie perene, de porte arbóreo-arbustivo, encontrada nas matas do sul do Brasil (MAGALHÃES, 2002). O interesse medicinal mais comum pela espinheira santa é para o tratamento de gastrites e úlceras gástricas e duodenais, sendo que o efeito do chá das folhas dessa espécie pôde ser comprovado cientificamente (FALEIROS, 1992). O estudo de frações hexânicas das folhas de *M. ilicifolia*, desenvolvido por Faleiros(1992), evidenciou que os compostos triterpênicos como friedelina e friedelanol, isolados por Ito (1991), são responsáveis por 50% dos efeitos antiulcerogênico da espinheira santa. Oliveira (1992), observou que as substâncias 4-O-metil - epigalocatequina e seu epímero 4'-O-metil-ent-galocatequina, isoladas do extrato aquoso de *M. ilicifolia*, reduziram a secreção gástrica de ácido clorídrico em ratos Wistar. *M. ilicifolia*. Outras

espécies da família Celastraceae foram investigadas sobre seus constituintes de ação citotóxica (ITOKAWA, 1993; SHIROTA, 1994).



**Figura 5** –*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss (espinheira santa), modificado de Magalhães, 2002.

Além da indicação de *M. ilicifolia* para o tratamento de úlceras estomacais, alguns constituintes antitumorais foram encontrados nos gêneros: *Maytenus* (maytansine e maytanprine), *Kokoona* (kokzeylanol e kokzeylanonol) e *Tripterygium* (triptolide e triptonide). Segundo Bérenger (1996), algumas espécies são utilizadas popularmente como febrífugo (*M. boaria* e *M. communis*).

*Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) (Figura 6), conhecido popularmente como chá-de-bugre, é uma planta de porte arbóreo, dotada de uma copa densa e arredondada, essa planta é nativa em quase todo o território nacional, mas é encontrada principalmente no Planalto Meridional (LORENZI, 2002).

Tem suas folhas amplamente utilizadas na medicina tradicional no tratamento de queimaduras e da herpes, mas a grande utilização do chá-de-brugre hoje é como diurético e redutor de apetite, tendo assim despertado grande interesse na indústria

farmacêutica (LORENZI, 2002). Os efeitos farmacológicos dessa planta devem-se principalmente a presença de terpenos e flavonóides (MARTINS *et al*, 2000).



**Figura 6** –*Casearia sylvestris* Sw. (chá-de-bugre), modificado de Backes e Irgang, 2003.

*Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. (Tiliaceae) (Figura 7), popularmente conhecida como açoita cavalo, é uma árvore decídua que apresenta grande importância devido a presença de fibras extremamente resistentes que compõem esse vegetal. Segundo Backes & Irgan (2003), sua madeira é de extrema importância econômica, sendo utilizada desde a fabricação de móveis a confecção de hélices de aviões. Sua aplicação medicinal é no tratamento de bronquite, laringites e disenterias, sendo suas folhas usadas por decocção ou infusão. Os estudos fitoquímicos do açoita cavalo, indicam que esse vegetal apresenta grande quantidade de taninos e monoterpenos, tanto na casca como no caule (LORENZI, 2002).



**Figura 7** –*Luehea divaricata* Mart. et. Zucc.(açoita cavalo), modificado de Backes e Irgang, 2003.

*Lippia alba* (Mill.) N.E. (Verbenaceae) (Figura 8), é um subarbusto com ramos arqueados, folhas inteiras com bordas serradas, nativa em toda a região sul do Brasil (LORENZI, 2002).



**Figura 8** –*Lippia alba* (Mill.) N.E.(sálvia), modificado de Lorenzi, 2002.

O chá de sálvia, como a espécie é designada popularmente, é utilizado como analgésico, devido à presença de grande quantidade de mirceno, e também apresenta atividade calmante e espasmolítica atribuídas a presença de citral, que desempenha

um efeito mucolítico, pois facilita a expectoração (LORENZI, 2002). De acordo com o mesmo autor, mirceno, citral e também limonemo, são os fitoquímicos presentes em quantidades relativamente altas, principalmente na parte aérea.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Recursos materiais**

O material necessário para a execução deste trabalho foi disponibilizado pelo Laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (vidrarias e reagentes, lâminas, microscópio óptico, contador de células, etc.).

#### **3.2. Material botânico**

Para a realização do trabalho foram utilizadas oito espécies de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), *Stevia rebaudiana* Bert (estévia), *Bauhinia*

*candicans* Benth (pata-de-vaca), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.(espinheira santa), *Casearia sylvestris* Sw. (chá de bugre), *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. (açoita cavalo) e *Lippia Alba* (Mill.) N.E. (sálvia), coletadas no setor de paisagismo do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG) e também no Campus Universitário da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Essas espécies foram secas em estufa de esterilização a temperatura de 60°C, durante 24 horas, para a obtenção da matéria seca.

### **3.3. Extrato bruto aquoso – Infusão (EBA)**

Para a obtenção do extrato bruto aquoso (EBA), foram utilizadas folhas ou inflorescências secas das espécies vegetais. Essas foram pesadas em balança de precisão, colocadas em erlenmeyer (500 mL) e, após, adicionada água destilada à temperatura de 100°C. Os recipientes foram hermeticamente fechados e deixados em repouso por 10 minutos. Após filtragem, o extrato aquoso obtido foi diluído de modo a obter-se quatro concentrações de cada espécie vegetal (5, 10, 20 e 40mg/mL)

### **3.4. Biotestes**

Os organismos testes utilizados foram sementes de alface, cultivar Rainha de Maio, e de cebola, cultivar Baia Periforme Precoce. As sementes de alface foram submetidas a resfriamento de 4°C por 72h para superação da dormência. Os

bioensaios foram realizados em câmara de germinação com temperatura controlada de 20°C, para ambas as espécies, seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). As sementes de alface e cebola foram acondicionadas em caixas gerbox (11 x 11 cm) forradas com papel mataborrão umedecido com 10mL dos extratos e água destilada utilizada como controle negativo. Foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes, para cada concentração dos extratos e do controle, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Para a análise dos Biotestes foram usadas quatro variáveis: índice de velocidade de germinação (IVG), com contagens diárias até o sétimo dia, para a alface, e décimo segundo dia, para a cebola, teste de primeira contagem aos quatro e seis dias, e teste de germinação ou de germinabilidade, aos sete e 12 dias para a alface e a cebola respectivamente, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992); e o índice mitótico IM.

Os valores das variáveis germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos através das seguintes expressões:

$$G = \frac{N}{A} 100,$$

onde:

G = percentual de germinação;

N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar;

$$\text{e } IVG = \frac{\sum n_i}{\sum n_i t_i},$$

onde:

IVG = índice de velocidade de germinação;

$n_i$  = número total de sementes germinadas num intervalo  $t_i$ ;

$t_i$  = intervalo de tempo.

### 3.5. Índice mitótico

Para a determinação do índice mitótico foi empregada a técnica de esmagamento (GUERRA e SOUZA, 2002). Foram coletadas as radículas dos organismos testes e fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por um período de 24h à temperatura ambiente e, após, acondicionadas em freezer. A preparação do material, para posterior análise do IM, foi realizada na seguinte ordem: água destilada por 5 minutos; HCl 5N por 20 minutos à temperatura ambiente; água destilada por 5 minutos. Após, as radículas foram transferidas para lâmina onde, em microscópio estereoscópico, foi retirada a coifa para a obtenção do meristema apical, adicionada orceína acética 2%, colocada uma lamínula sobre o material esmagado, e posteriormente aquecida. As lâminas das células de alface e de cebola foram observadas em microscópio óptico a uma magnitude de 400x.

Foram contadas, através da técnica de varredura, 2000 células por concentração para cada bioteste. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observado e multiplicando-se por 100, através da seguinte expressão.

$$IM = \frac{NCM}{NTC} 100,$$

onde:

- $IM$  = índice mitótico;
- $NCM$  = número de células em mitose;
- $NTC$  = número total de células observadas.

Foi observado também a presença de alterações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos, sendo essas análises realizadas somente ao nível qualitativo.

Os critérios para aceitar a presença das alterações cromossômicas observadas, estão de acordo com Picker e Fox (1986) e estão descritas a seguir:

- quebras cromatídicas equivalentes a perda de cromátides do cromossomo ou por fragmentação que ocorrem nas cromátides durante a divisão celular;
- não disjunção dos cromossomos no final da metáfase, formando estruturas denominadas de pontes anafásicas, alterações essas observadas no início da anáfase;
- fuso acromático desestabilizado podendo provocar perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular;
- presença de micronúcleo (MN) equivalente a uma estrutura de contorno regular, redondo ou oval, e devendo estar dentro do citoplasma de uma célula; o MN deve estar no mesmo plano de foco de observação e nitidamente separado do núcleo.

### **3.6. Limpeza das lâminas**

As lâminas usadas para preparação do material para a análise ao microscópio foram previamente limpas da seguinte maneira:

- esfregação com flanela seca;
- colocação em cubetas de vidro, adição de ácido acético P.A. e imersão por um período de 24 horas;
- retirada do ácido acético e secagem a temperatura ambiente;
- após secagem, colocação em álcool bruto (98%) por 15 minutos;

- secas novamente e colocadas em etanol durante 15 minutos;
- escorridas e, ainda umedecidas, polidas com flanela.

### **3.7. Coleta e fixação**

A obtenção das células meristemáticas dos bioensaios, para a análise do IM, foi realizada com coletas das sementes, aos quatro dias para a alface ( $2n=18$ ), e aos seis dias para a cebola ( $2n=16$ ). Após, as sementes germinadas foram fixadas em fixador Carnoy 3:1, preparado previamente, através da seguinte metodologia:

- misturou-se 15mL de etanol com 5mL de ácido acético glacial P.A.
- agitou-se a solução antes e depois de acrescentar o material a ser fixado
- o fixador foi preparado imediatamente antes de ser usado e a quantidade foi aproximadamente 10 vezes o volume do material a ser fixado.

### **3.8. Análise Estatística**

Cada uma das oito espécies medicinais constituiu um experimento, sendo todos os oito experimentos conduzidos da mesma forma. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com quatro repetições, e o delineamento de tratamento foi fatorial 2 x 5, sendo os fatores Bioteste (Alface e Cebola) e Concentração (0, 5, 10, 20 e 40 mg/mL).

As variáveis analisadas foram: primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM). A unidade experimental consistiu de uma caixa gerbox com 100 sementes, para as variáveis primeira contagem, germinação e IVG, e uma lâmina onde foram observadas 500 células, para a variável IM. As variáveis primeira contagem, germinação e IM foram transformadas segundo arco seno de  $\sqrt{x/100}$ .

A análise estatística dos dados consistiu de análise da variação e decomposição da variação dos fatores através de regressão polinomial, para o fator quantitativo (Concentração), e comparação de médias pelo teste DMS de Fisher, para o fator qualitativo (Bioteste). Na regressão polinomial, os critérios utilizados para a adoção do modelo foram a significância ( $\alpha = 0,05$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) do mesmo. Estabeleceu-se arbitrariamente o valor mínimo para o  $r^2$  de 0,6.

As análises estatísticas foram executadas pelo programa WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows – Versão Beta (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2005).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados abaixo descritos referem-se às variáveis primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM), analisados nos biotestes para as seguintes espécies medicinais: *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), *Stevia rebaudiana* Bert (estévia), *Bauhinia candicans* Benth (pata-de-vaca), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (espinheira santa), *Casearia sylvestris* Sw. (chá de bugre), *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. (açoita cavalo) e *Lippia Alba* (Mill.) N.E. (sálvia).

Na análise de regressão polinomial os modelos estatísticos que não apresentaram  $p < 0,05$  e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) superior a 0,60, foram desconsiderados mesmo que tenham sido significativos.

Os resultados da análise da variação, relativos à espécie medicinal *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela), são apresentados na tabela A1 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração



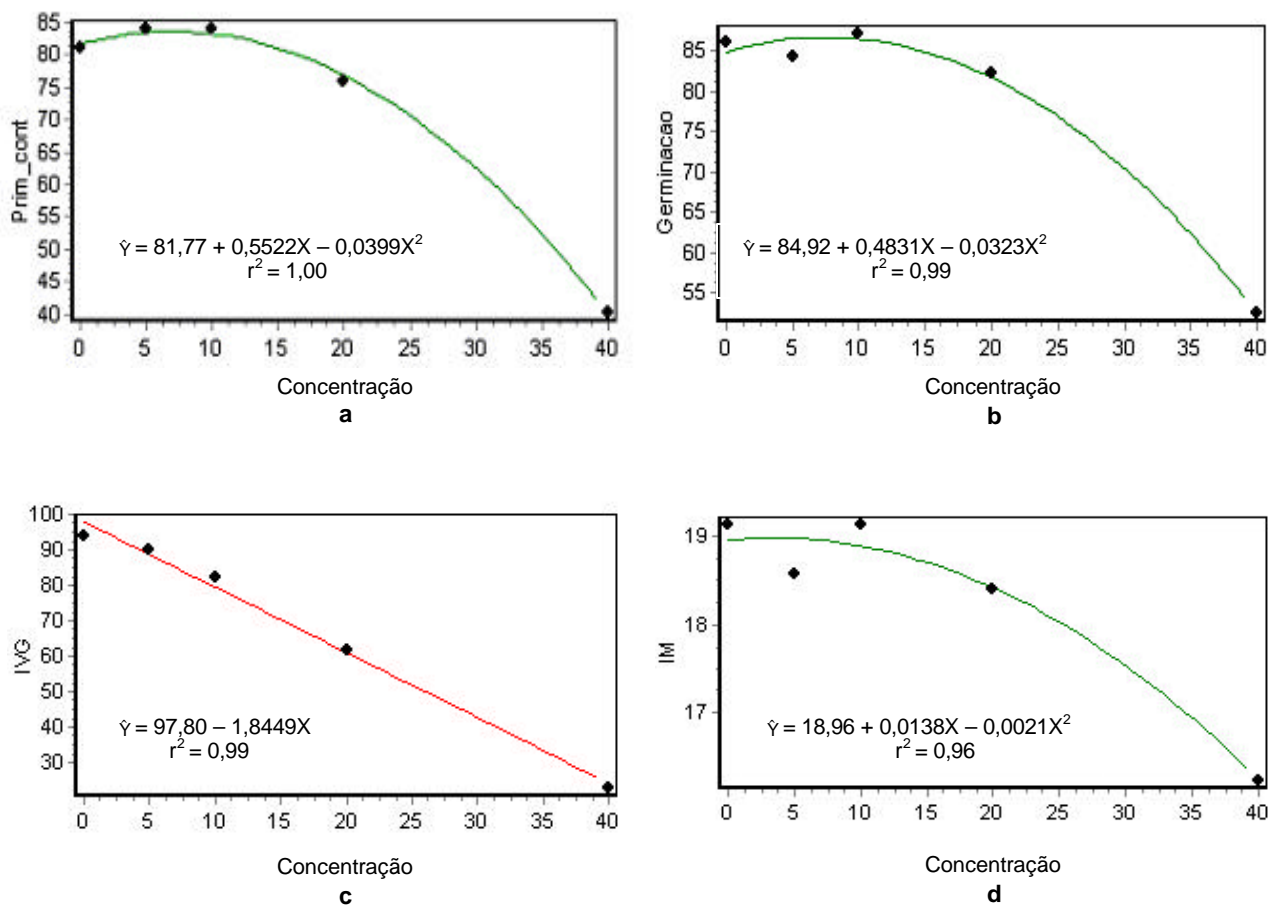
foram significativos para todas as variáveis. A significância da interação justifica o estudo dos efeitos simples de cada um dos fatores dentro dos níveis do outro. Na tabela 1 são apresentados os resultados dos testes de comparação de médias dos Biotestes, dentro de cada nível do fator Concentração. Foi verificado para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM, que as médias da alface foram superiores às médias da cebola nas concentrações de 0, 5, 10 e 20 mg/mL. Na concentração de 40mg/mL a média da alface foi superada pela da cebola na variável primeira contagem sendo que não houve diferença entre as médias dos biotestes para as variáveis, germinação, IVG e IM. As análises de regressão entre concentração e todas as variáveis analisadas, para alface, estão apresentadas na figura 9, e para cebola, com as variáveis germinação e IM na figura 10.

**Tabela 1.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, germinação, IVG (índice de velocidade de germinação) e IM (índice mitótico), relativas a espécie medicinal *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num. Obs.	Primeira contagem	Germinação	IVG	IM
0	Alface	4	81,15 a	86,07 a	93,82 a	19,14 a
	Cebola	4	47,73 b	51,51 b	17,45 b	18,53 b
5	Alface	4	84,04 a	84,42 a	82,42 a	19,14 a
	Cebola	4	44,69 b	47,66 b	14,37 b	17,60 b
10	Alface	4	84,04 a	87,13 a	90,00 a	18,58 a
	Cebola	4	44,71 b	50,49 b	16,45 b	17,51 b
20	Alface	4	76,08 a	82,14 a	61,75 a	18,41 a
	Cebola	4	46,15 b	53,19 b	16,20 b	17,56 b
40	Alface	4	40,17 b	52,48 a	22,63 a	16,22 a
	Cebola	4	48,75 a	58,63 a	17,59 a	16,48 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figura 9 (a, b e d), observa-se que houve uma relação quadrática entre a concentração do extrato e as variáveis primeira contagem, germinação e o IM, com ponto de máxima no intervalo entre as concentrações de 5 e 10mg/mL, evidenciando assim um efeito alelopático do extrato de marcela sobre sementes de alface.



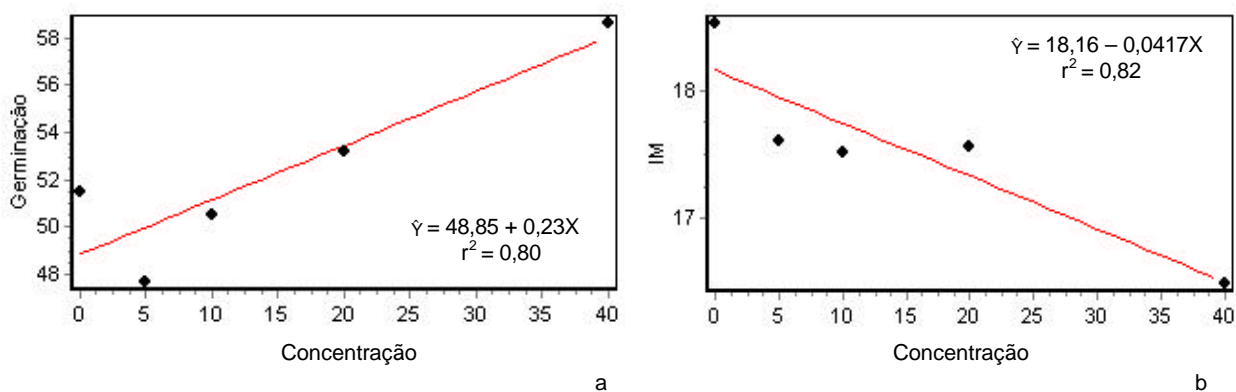
**Figura 9.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice mitótico (IM) em sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Gatti *et al.*, (2004), em estudos sobre o efeito do extrato obtido das folhas de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze (papo de peru) sobre a germinação de sementes de alface e de rabanete, observaram que, o extrato aquoso obtido das folhas inibiu a germinação das sementes dos bioensaios em todas as concentrações analisadas.

Carvalho *et al.* (1996) também verificaram potencial alelopático de folhas verdes de *Sacharum officinalis* L. (cana-de-açúcar), sobre sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* L. (sabiá), que variava em função das concentrações testadas. Através do teste cometa, realizado com células medulares de ratos *Wistar*, Silva *et al.*, (2003), observaram um possível efeito genotóxico do extrato de *Achyrocline satureioides*.

Em relação ao IVG (Figura 9c), foi observado que o mesmo apresentou uma relação linear negativa com a concentração do extrato aquoso de marcela, isto é, o aumento da solução do extrato promoveu uma diminuição dessa variável. Segundo Ferreira e Borghetti (2004), freqüentemente, o efeito alelopático não se dá sobre a germinabilidade (percentual final de germinação), mas sobre a velocidade de germinação ou sobre outro parâmetro do processo.

A concentração do extrato aquoso de marcela apresenta uma relação linear positiva com a variável germinação e uma relação linear negativa com IM em sementes de cebola (Figura 10a e b)



**Figura 10.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis Germinação e índice Mitótico (IM) para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Esses dados demonstram que, com o incremento da concentração ocorreu um aumento no potencial da germinação de sementes de cebola (Figura 10a). Alves *et al.*, (2004), verificaram efeito semelhante de extratos voláteis extraídos do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Ward. (jaborandi), onde as concentrações analisadas estimularam o crescimento e o desenvolvimento de sementes de alface.

Houve uma diminuição no índice de divisão celular (IM), no bioteste cebola, acordo com o aumento da concentração do extrato aquoso de marcela (Figura 10b). Resultado semelhante foi encontrado por Cattelan *et al* (2005), sobre sementes da mesma espécie na avaliação do possível efeito citotóxico e genotóxico de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim). Os autores verificaram que o extrato aquosos inibiu o IM nas concentrações testadas.

A análise de variação, relativa à espécie medicinal *Mikania glomerata* Spreng (guaco), está apresentada na tabela A2 do Anexo. Esta análise demonstrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos, para primeira contagem, germinação e IVG. A tabela 2 apresenta os resultados dos testes de comparação de médias dos dois biotestes dentro de cada nível do fator Concentração. Foi observado que nas variáveis primeira contagem, germinação e IVG as médias da alface superaram as médias da cebola apenas no controle, sendo que nas demais concentrações as médias da alface foram superadas pelas médias da cebola em todas as variáveis analisadas.

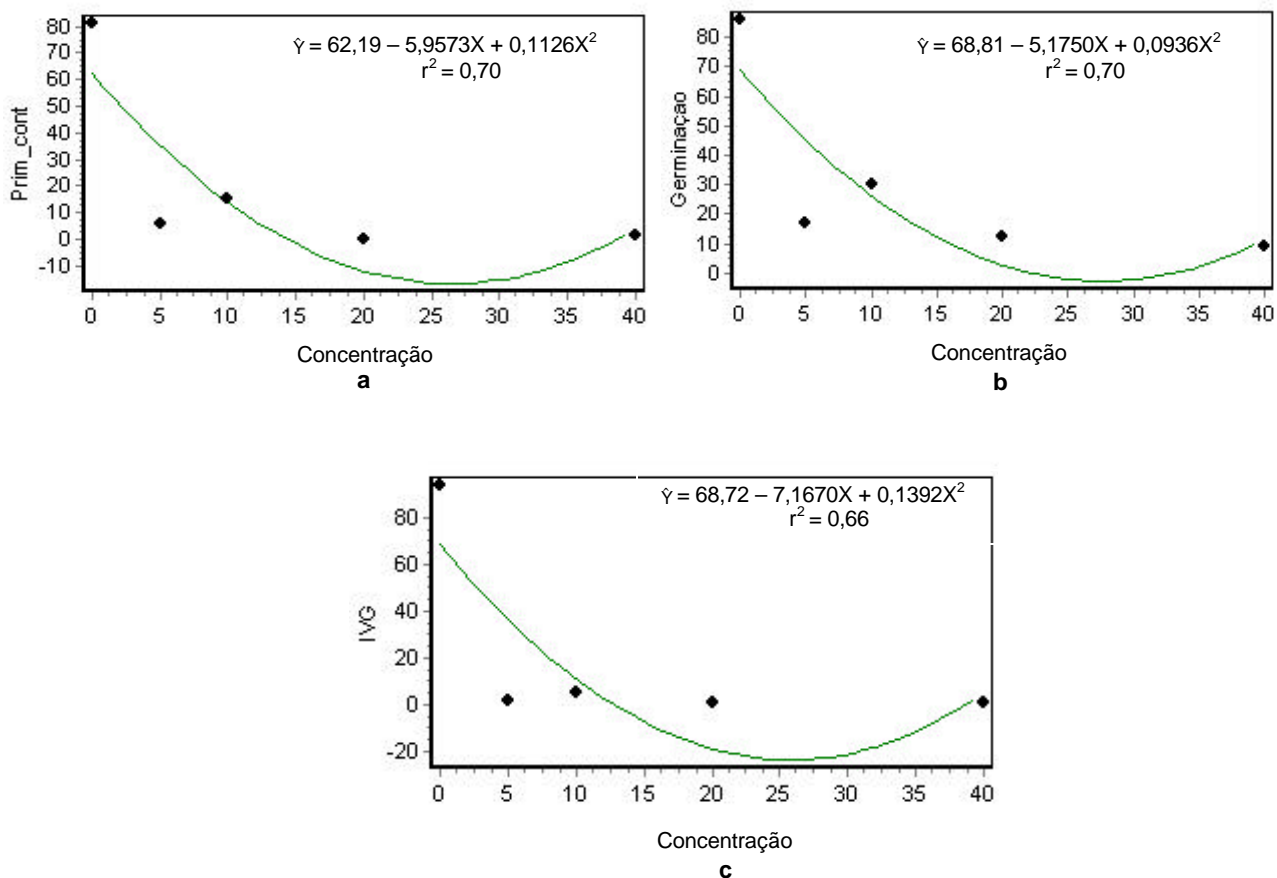
Os resultados da ação do extrato aquoso de guaco, sobre sementes de alface, mostram que as variáveis primeira contagem, germinação e IVG apresentaram uma relação quadrática com as diferentes concentrações dessa espécie medicinal (Figura 11 a, b e c), ou seja, o incremento da concentração acarretou decréscimo nos valores

dessas três variáveis até concentrações próximas a 30mg/mL, para após propiciar um novo aumento das mesmas. Conforme Mazzafera (2003), o extrato aquoso de *Syzygium romaticum* (L) Merr. e Perry (cravo-da-índia) apresentou uma forte inibição na germinação e na velocidade de germinação de várias sementes entre elas, alface e tomate, demonstrando também o potencial alelopático da espécie. Verificou-se que, o aumento da concentração promoveu uma ação citotóxica sobre as células meristemáticas de sementes de alface. Segundo Pereira *et al.*, (2002), diversas espécies medicinais já tiveram o seu potencial citotóxico e genotóxico estudado, entre elas, a sucupira, a goiabeira vermelha e a carqueja, que em concentrações elevadas demonstraram a sua potencialidade tóxica.

**Tabela 2.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, germinação, Índice de velocidade de germinação (IVG), relativos à espécie medicinal *Mikania glomerata* Spreng. Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

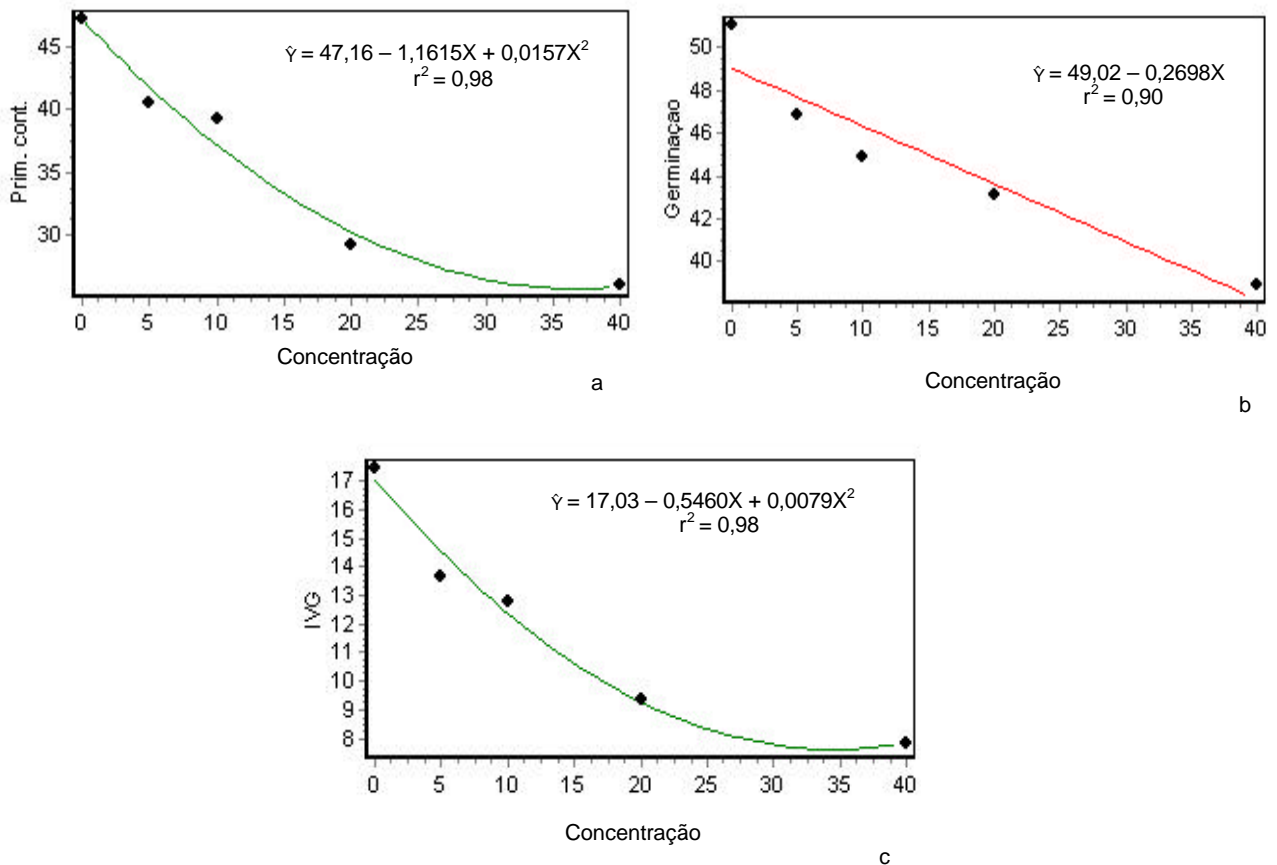
Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num, obs,	Primeira contagem	Germinação	IVG
0	Alface	4	81,15 a	86,06 a	93,79 a
	Cebola	4	47,16 b	51,07 b	17,44 b
5	Alface	4	15,32 b	29,97 b	4,95 b
	Cebola	4	40,54 a	46,87 a	13,65 a
10	Alface	4	5,50 b	16,93 b	1,62 b
	Cebola	4	39,23 a	44,86 a	12,77a
20	Alface	4	0 b	12,49 b	0,79 b
	Cebola	4	29,16 a	43,13 a	9,35 a
40	Alface	4	1,43 b	9,39 b	0,78 b
	Cebola	4	26,01 a	38,94 a	7,83 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 11.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação e índice de Velocidade de Germinação (IVG) para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng.

Nas análises de regressão para o bioteste cebola, houve uma relação quadrática entre concentração e as variáveis primeira contagem e IVG, com pontos de mínimo entre as concentrações de 30 e 40mg/mL(Figura 12a e c) Resultados semelhantes foram obtidos por Prates *et al.*, (2001), em sementes de milho tratadas com extrato aquoso de *Leucaena leucocephala*, os autores observaram que os extratos dessa planta inibiram o IVG e afetaram a divisão celular dos meristemas radiculares da espécie. A análise também revelou que a concentração mais elevada do extrato de guaco acarretou um efeito genotóxico sobre as células meristemáticas de cebola, levando a formação de micronúcleos (Figura 13).

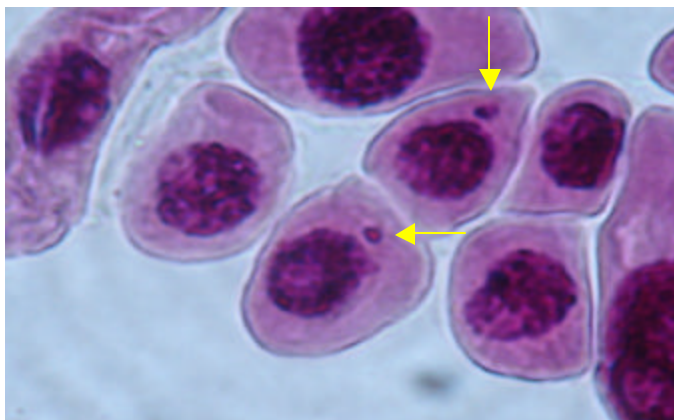


**Figura 12.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM) para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng.

Uma relação linear negativa ocorreu entre a germinação de sementes de cebola e as diferentes concentrações do extrato aquoso de guaco (Figura 12b), evidenciando que a germinabilidade das sementes do bioteste foi inversamente proporcional ao incremento da concentração. Esses dados corroboram com os estudos de Pires *et al.*, (2001), onde o aumento das concentrações do extrato aquoso de *Leucena leucocephala* (L) de Wit (leucena) apresentou efeito tóxico na germinação de sementes de picão-preto e caruru.

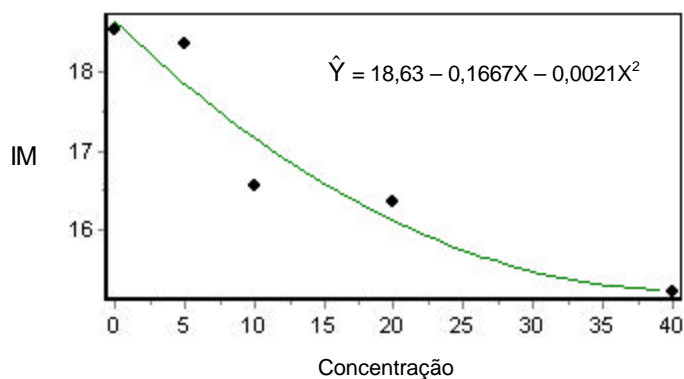
Na variável IM não houve efeito significativo da interação e nem do efeito principal de Bioteste, ou seja, as médias das espécies alface e cebola não diferiram

estatisticamente entre si, havendo, entretanto significância do efeito principal de Concentração (Tabela A2 e Figura 14), melhor expressa através da relação quadrática.



**Figura 13.** Células meristemáticas de cebola, apresentando micronúcleos, tratadas com extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng na concentração de 40mg/mL (400x).

Pinho *et al* (2005), utilizaram meristemas radiculares de bulbos de cebola no monitoramento do efeito do extrato aquoso de *Baccharis trimera* L. (carqueja), e observaram que o extrato aquoso dessa espécie reduziu o ciclo mitótico, em concentrações elevadas, e também propiciou o surgimento de anormalidades cromossômicas.



**Figura 14.** Gráfico da curva ajustada e das médias observadas, para a variável Índice Mitótico (IM) em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng.



Os dados da análise de variação, relativo à espécie medicinal *Stevia rebaudiana* Bert. (estévia), são apresentados na tabela A3 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos nas variáveis IVG e IM. Os resultados do teste de comparação de médias dos dois biotestes, dentro de cada nível do fator Concentração, estão apresentados na tabela 3. Foi observado que, para a variável IVG, as médias da alface foram superiores em todas as concentrações analisadas. Em relação ao IM, a média da alface foi superior somente no controle (0 mg/mL), nas demais concentrações, não houve diferença entre os biotestes.

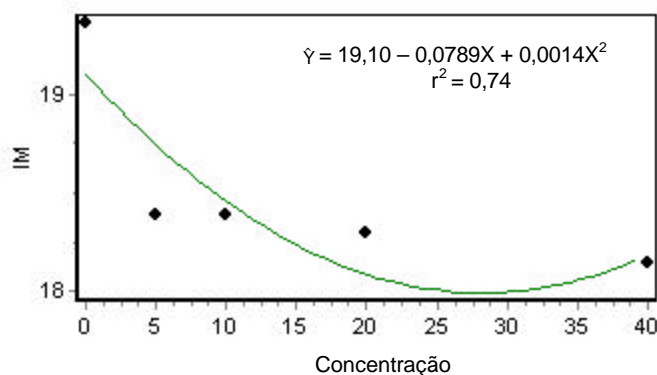
**Tabela 3.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice Mitótico (IM), relativos a espécie *Stevia rebaudiana* Bert. Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num, obs,	IVG	IM
0	Alface	4	90,77 a	19,36 a
	Cebola	4	18,87 b	18,43 b
5	Alface	4	75,49 a	18,39 a
	Cebola	4	17,84 b	18,39 a
10	Alface	4	59,82 a	18,39 a
	Cebola	4	18,92 b	18,41 a
20	Alface	4	60,22 a	18,29 a
	Cebola	4	14,81 b	18,39 a
40	Alface	4	65,93 a	18,15 a
	Cebola	4	17,19 b	18,27 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

A análise de regressão entre concentração e IM para sementes de alface tratadas com extrato aquoso de estévia (Figura 15), demonstrou uma relação

quadrática. Houve uma diminuição do IM com o aumento da concentração do extrato, com ponto de mínimo entre 25 e 30mg/mL.



**Figura 15.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para a IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bert..

Em estudos para avaliar o possível efeito citotóxico e genotóxico de estévia, Nunes e Araújo (2003), analisaram células da medula óssea de ratos *Wistar*, e observaram que os animais tratados com diferentes concentrações de esteviosídeo não apresentaram lesões no DNA através do ensaio cometa.

Para as variáveis primeira contagem, e germinação somente o efeito principal de bioteste foi significativo (Tabela A3), evidenciando uma diferença entre as médias de primeira contagem (85,53 e 48,74) e de germinação (87,75 e 51,60), para alface e cebola, respectivamente.

Os resultados da análise de variação, relativo a espécie medicinal *Bauhinia candicans* Benth.. (pata de vaca), são apresentados na tabela A4 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos para as variáveis IVG e IM. Na tabela 4 são apresentados os resultados dos testes de comparação de médias dos dois bioensaios, dentro de cada nível do fator Concentração. Foi verificado que, para a variável IVG, as médias da

alface superaram as médias da cebola em todas as concentrações analisadas. Na variável IM, as médias da alface superaram as médias da cebola nas concentrações de 0, 5 e 20 mg/mL, enquanto nas demais concentrações, em relação a mesma variável, não houve diferença entre as médias dos biotestes.

**Tabela 4.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM), para a espécie *Bauhinia candicans* Benth. Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

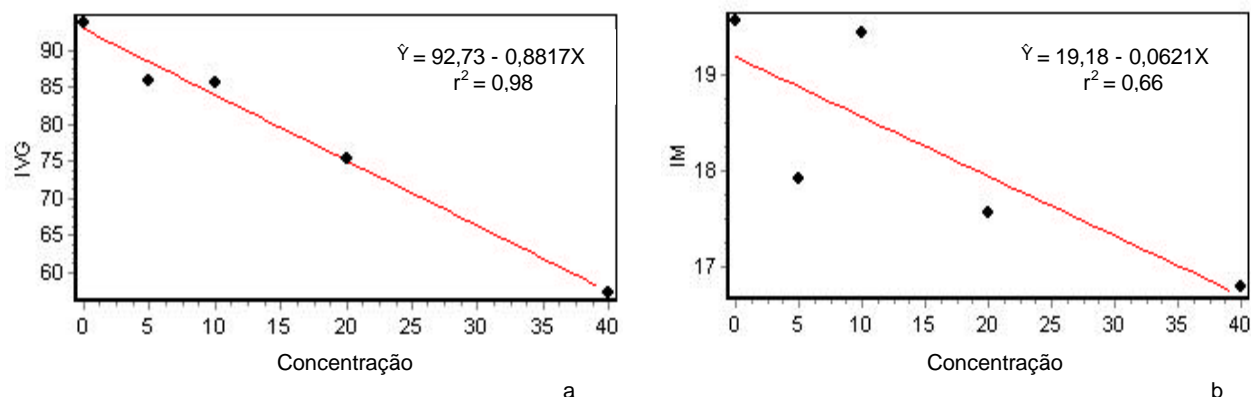
Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num. obs.	IVG	IM
0	Alface	4	93,67 a	19,56 a
	Cebola	4	18,92 b	17,72 b
5	Alface	4	85,56 a	19,44 a
	Cebola	4	18,12 b	17,47 b
10	Alface	4	85,74 a	17,91 a
	Cebola	4	16,95 b	17,50 a
20	Alface	4	75,28 a	17,56 a
	Cebola	4	13,81 b	16,18 b
40	Alface	4	57,29 a	16,79 a
	Cebola	4	16,10 b	16,53 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

As análises de regressão entre concentração e as variáveis IVG e IM, para alface, estão apresentadas na figura 16, e para a cebola com a variável IM, na figura 17.

Na figura 16, verifica-se que houve uma relação linear negativa entre as variáveis IVG e IM, ou seja, com o aumento da concentração houve uma redução das variáveis acima citadas, demonstrando assim um efeito inibitório do extrato aquoso de pata de vaca sobre sementes de alface. Ferreira e Áquila (2000), apontam que a germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento das plântulas, pois as substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais,

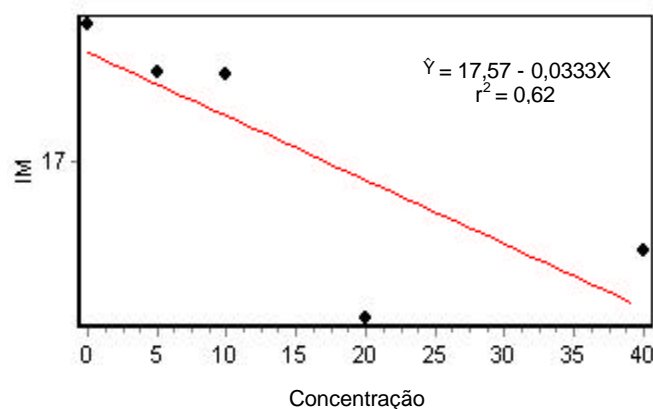
onde a necrose é o sintoma mais evidente. Um efeito citotóxico (Figura 16d) do extrato aquoso de pata-de-vaca também foi verificado, pois, o aumento da concentração do extrato acarretou uma inibição do ciclo celular nos meristemas radiculares de alface.



**Figura 16.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM) em sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Bauhinia candicans* Benth.

Silva e Cechinel-Filho (2002), estudaram os principais compostos químicos presente nas plantas do gênero *Bauhinia* e encontraram entre eles, alcalóides, terpenos, glicosídeos, flavonóides e esteróides, esses fitoquímicos que, além de promoverem efeitos inibitórios na germinação de sementes, podem ocasionar efeitos ao nível celular da planta teste (Rice, 1984).

Na figura 17 observa-se que houve uma relação linear negativa entre a concentração e a variável IM no bioteste utilizando sementes de cebola. Esses dados corroboram com os encontrados por Buttow *et al.*, (2003), onde na análise de células meristemáticas de bulbos de cebolas tratados com o extrato aquoso de pata-de-vaca, verificaram que, o aumento da concentração analisada promovia uma inibição do IM nesse bioensaio.



**Figura 17.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para a variável IM em sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Bauhinia candicans* Benth.

Nas variáveis primeira contagem e germinação, somente o efeito principal de Bioteste foi significativo (Tabela A4), evidenciando uma diferença entre as médias de primeira contagem, 78,37 e 48,40 e de germinação, 79,92 e 52,06, para alface e cebola, respectivamente.

Os resultados da análise da variação relativos a espécie medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (espinheira santa), são apresentados na tabela A5 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos para todas as variáveis. A significância da interação justifica o estudo dos efeitos simples de cada um dos fatores dentro dos níveis do outro. Na tabela 5 estão apresentados os resultados dos testes de comparação das médias dos dois biotestes, dentro de cada nível do fator Concentração. Para a variável IVG, as médias da alface foram superiores às médias da cebola em todas as concentrações; para as variáveis primeira contagem e germinação, as médias da alface foram superiores as médias da cebola em todas as concentrações, exceto para 40 mg/mL, onde a cebola superou a alface para a variável primeira contagem, e não diferiu da

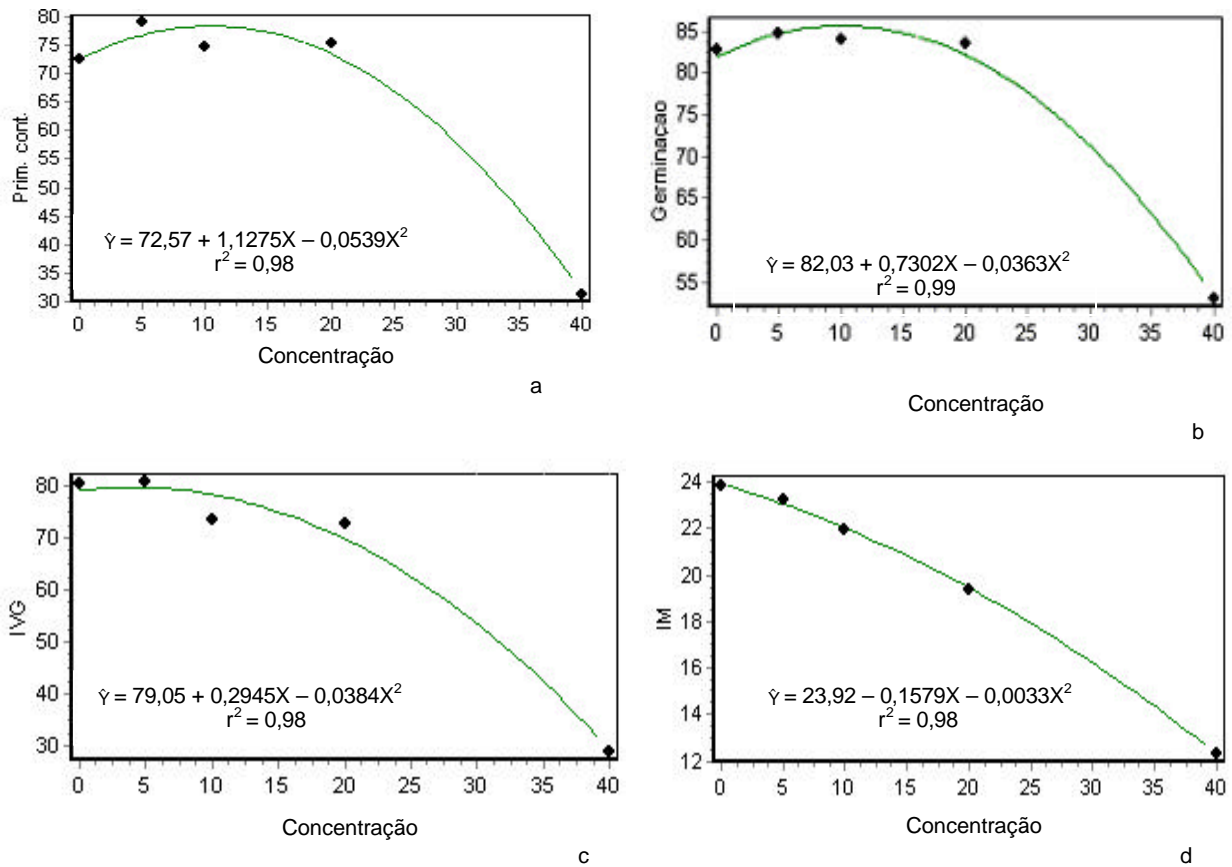
alface para a variável germinação. Com relação a variável IM, a cebola foi superior à alface nas concentrações 0, 5 e 10 mg/mL, não diferindo da alface na concentração de 20mg/mL e sendo inferior na concentração de 40 mg/mL.

**Tabela 5.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM), para a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num. Obs.	Primira Contagem	Germinação	IVG	IM
0	Alface	4	72,48 a	82,70 a	80,17 a	23,80 b
	Cebola	4	39,23 b	47,53 b	13,11 b	41,53 a
5	Alface	4	74,74 a	83,96 a	73,31 a	21,97 b
	Cebola	4	37,14 b	42,26 b	10,83 b	28,38 a
10	Alface	4	79,12 a	84,73 a	80,63 a	23,26 b
	Cebola	4	38,25 b	42,98 b	12,03 b	37,38 a
20	Alface	4	75,35 a	83,44 a	72,74 a	19,37 a
	Cebola	4	38,62 b	43,71 b	11,57 b	21,23 a
40	Alface	4	31,19 b	52,97 a	28,84 a	12,30 b
	Cebola	4	41,96 a	44,57 a	11,29 b	24,00 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

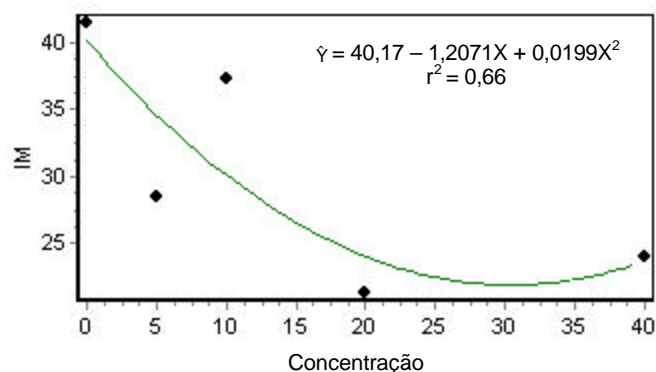
As análises de regressão entre concentração e as variáveis primeira contagem, germinação, IVG e IM, para a alface, estão apresentadas na figura 17. Observa-se que houve uma relação quadrática negativa entre a concentração e as variáveis analisadas. Em relação a primeira contagem e a germinação, ocorreu um aumento dessas variáveis até a concentração de 10mg/mL. Isto indica que os constituintes presentes no extrato aquoso de espinheira santa até a concentração de 20 mg/mL, não sejam fitotóxicos para as sementes de alface.



**Figura 18.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice mitótico (IM) para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss

Segundo Rice (1984), alguns compostos têm atividade alelopática inibitória em altas concentrações, mas em menores também podem estimular o mesmo processo, corroborando assim os resultados encontrados nas sementes de alface tratados com o extrato aquoso de espíneira santa. Um efeito citotóxico do extrato também foi observado sobre as células do meristema de alface com o aumento da concentração (Figura 18d). Camparato *et al.*, (2002), em análises de células meristemáticas de bulbos de *Allium cepa* (cebola), verificaram que a concentração mais elevada promoveu uma regressão no IM, mas não o surgimento de alterações cromossômicas.

A figura 19 demonstra uma relação quadrática entre a concentração do extrato aquoso de espinheira santa e a variável IM nas células meristemáticas das sementes de cebola.



**Figura 19.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para a variável IM em sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

A concentração de 40mg/mL promoveu o surgimento de alterações cromossômicas como a presença de pontes anafásicas (Figura 20). Teixeira *et al.*, (1997), através do teste de Smart, verificaram efeito genotóxico de *Maytenus ilicifolia* sobre os discos imaginiais de *Drosophila melanogaster*.



**Figura 20.** Célula meristemática de cebola, apresentando ponte anafásica, na concentração de 40mg/mL do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.(400x).



Os resultados da análise de variação, relativo a espécie medicinal *Casearia sylvestris* Sw (chá-de-bugre), são apresentados na Tabela A6 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal de Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos em todas as variáveis, exceto para IM. A tabela 6 apresenta os resultados dos testes de comparação de médias das duas espécies, dentro de cada nível do fator Concentração. Observa-se que as médias da alface foram superiores as médias da cebola em todas às variáveis analisadas nas concentrações de 0, 5, 10 e 40mg/mL. Para as variáveis primeira contagem e germinação, na concentração de 20 mg/mL, as médias da cebola foram superiores as médias da alface, enquanto que para a variável IVG, nesta mesma concentração, não houve diferença entre as médias dos biotestes.

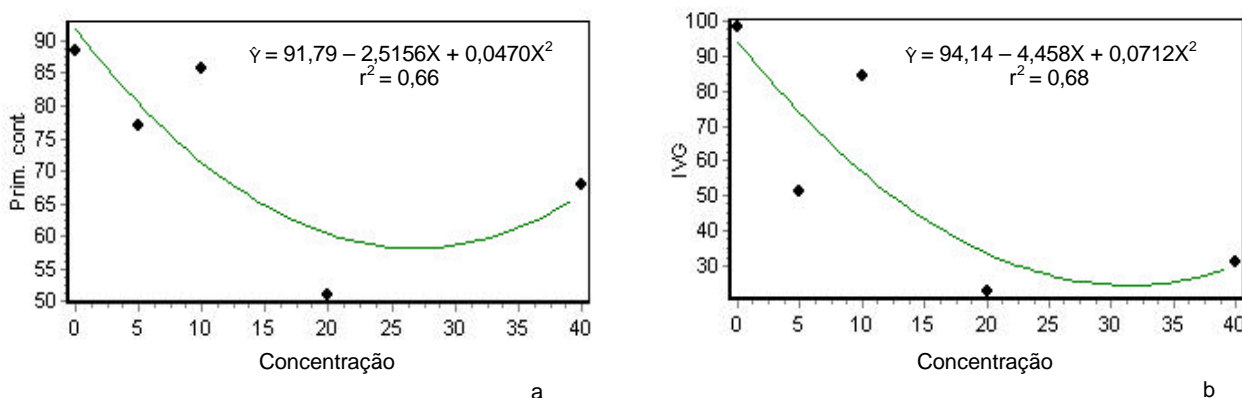
**Tabela 6.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação e IVG, para a espécie *Casearia sylvestris* Sw Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num, obs,	Primeira contagem	Germinação	IVG
0	Alface	4	88,57 a	88,57 a	98,50 a
	Cebola	4	67,97 b	69,42 b	29,12 b
5	Alface	4	85,70 a	88,57 a	84,38 a
	Cebola	4	63,92 b	66,35 b	21,46 b
10	Alface	4	77,10 a	81,04 a	51,17 a
	Cebola	4	60,61 b	62,56 b	21,93 b
20	Alface	4	50,96 b	55,51 b	22,50 a
	Cebola	4	62,50 a	67,18 a	22,12 a
40	Alface	4	67,88 a	75,55 a	31,02 a
	Cebola	4	59,52 b	63,32 b	21,10 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

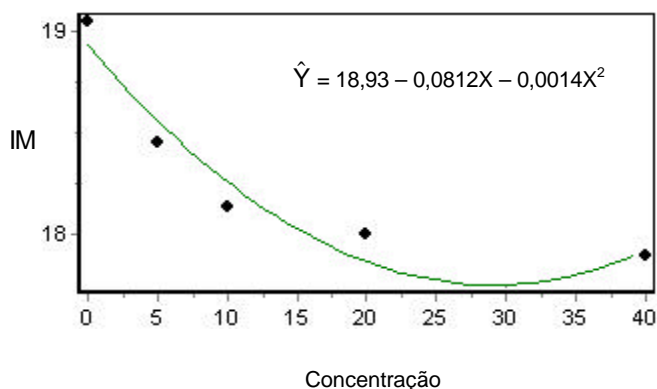
A análise de regressão da primeira contagem e do IVG para alface, apresentou uma relação quadrática entre essas variáveis e as concentrações do extrato aquoso de

chá-de-bugre (Figura 21a e b). Esses resultados também foram verificados por Gatti *et al.*, (2004), que analisaram a ação do extrato aquoso obtido das raízes de *Aristolochia esperanzae* O Kuntze (papo-de-peru) sobre sementes de alface e rabanete.



**Figura 21.** Gráficos das curvas ajustadas e das médias observadas para as variáveis primeira contagem (Índice de Velocidade de Germinação) IVG para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* Sw.

Para a variável IM não houve significância da interação e nem do efeito principal de Bioteste, ou seja, as médias dos biotestes alface e cebola não diferiram estatisticamente entre si, havendo, entretanto, significância do efeito principal de Concentração (Tabela A6, Figura 22)



**Figura 22.** Gráfico da curva ajustada e das médias observadas, para a variável Índice Mitótico em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* Sw.

O efeito citotóxico de plantas medicinais nativas da região sul do Brasil também foi verificado por Büttow *et al* (2003), que ao utilizarem extratos aquosos de *Schinus*

*molle* L (aroeira-mansa), verificaram uma diminuição no ciclo celular em células meristemáticas de bulbos de cebola.

Os resultados da análise da variação, relativo a espécie medicinal *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. (açoita cavalo), são apresentados na tabela A7 do Anexo. Esta análise mostrou que o efeito principal do Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos, para as variáveis primeira contagem, IVG e IM. A significância da interação justifica o estudo dos efeitos simples de cada um dos fatores dentro dos níveis do outro. Na tabela 7 são apresentados os resultados do teste de comparação das médias dos biotestes, dentro de cada nível do fator Concentração. Nas variáveis primeira contagem, IVG e IM as médias da alface foram superiores em às médias da cebola nas concentrações de 0, 5, 10 e 20 mg/mL.

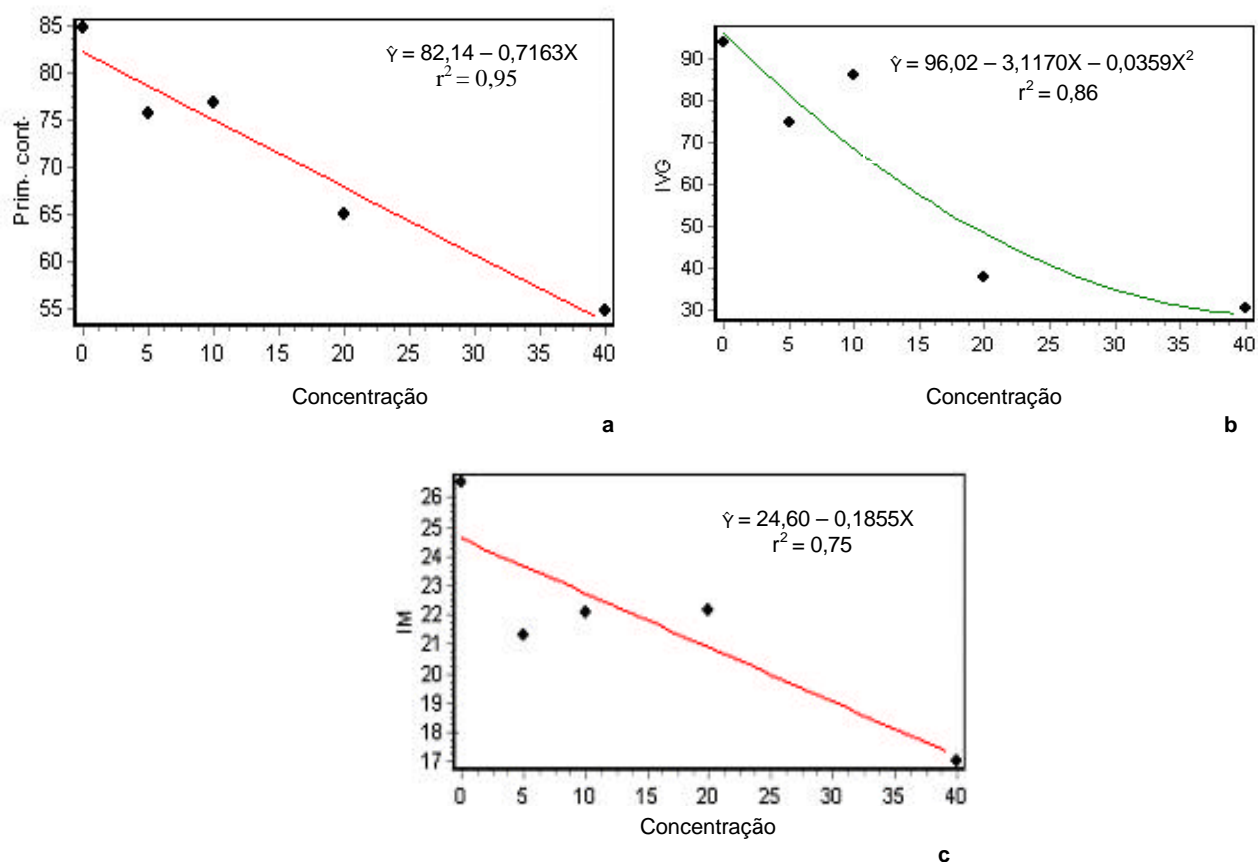
**Tabela 7.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis primeira contagem, índice de velocidade de germinação (ÍVG) e índice mitótico (IM), para a espécie *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num. obs.	Primeira contagem	IVG	IM
0	Alface	4	84,74 a	93,67 a	26,53 a
	Cebola	4	50,66 b	18,87 b	20,10 b
5	Alface	4	76,90 a	85,97 a	22,08 a
	Cebola	4	47,31 b	17,84 b	18,27 b
10	Alface	4	75,63 a	74,91 a	21,32 a
	Cebola	4	51,11 b	18,92 b	18,43 b
20	Alface	4	64,86 a	37,72 a	22,16 a
	Cebola	4	45,00 b	14,81 b	18,43 b
40	Alface	4	54,85 a	30,38 a	17,01 a
	Cebola	4	49,66 a	17,19 b	18,51 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

Na concentração de 40mg/mL foi verificado que, não houve diferença para as variáveis primeira contagem e IM entre as médias de alface e cebola, porém para a

variável IVG, na mesma concentração, a média da alface foi superior a média da cebola. As análises de regressões das variáveis primeira contagem e IM (Figura 23 a e c), para o bioteste alface, demonstram uma relação linear negativa com a concentrações do extrato aquoso de açoitã cavalo, e para a variável IVG, uma relação quadrática com ponto de mínimo ao redor da concentração 40mg/mL (Figura 23b), ou seja, as variáveis se comportaram de forma inversamente proporcional ao incremento da concentração do extrato aquoso de açoitã cavalo.



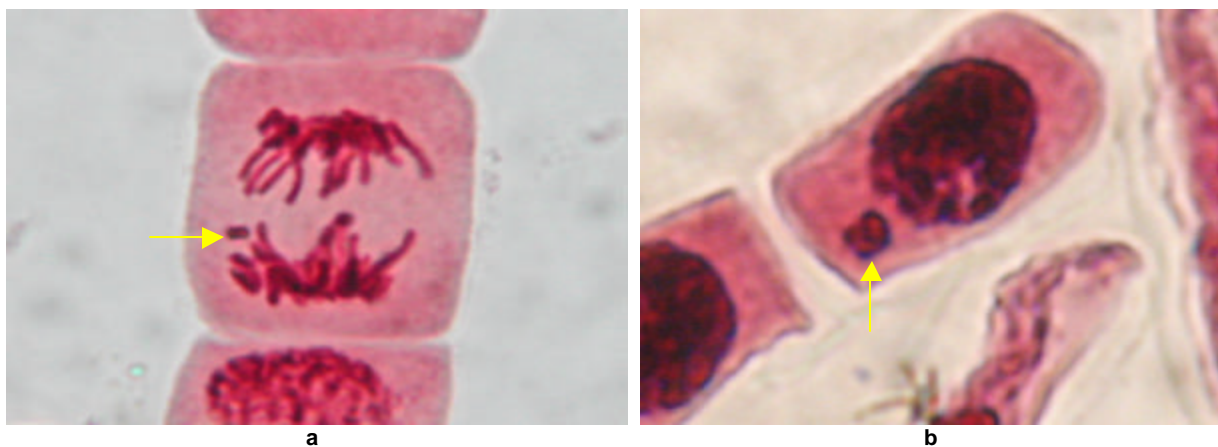
**Figura 23.** Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, (Índice de Velocidade de Germinação) IVG e (Índice Mitótico) IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc

Segundo Rodrigues *et al.*, (1992), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento e influenciam diretamente na velocidade de emissão das

radículas das plantas testes, pois interferem na divisão celular, na permeabilidade das membranas e na ativação de enzimas.

Na variável germinação, somente o feito principal de Bioteste foi significativo (Tabela A7), evidenciando uma diferença entre as médias da alface (75,84) e da cebola (51,60).

Foi verificado efeito genotóxico do extrato aquoso de açoita cavalo na concentração de 40 mg/mL, tanto em meristemas radiculares de alface, através do surgimento de quebras cromossômicas, como nas de cebola, pela formação de micronúcleos (Figura 24). Silva *et al.*, (2003), analisando a ação de extratos aquosos de plantas medicinais, verificaram a genotoxicidade, através do ensaio cometa, com células medulares de ratos *Wistar*, do extrato aquoso de açoita cavalo em concentrações elevadas.



**Figura 24.** Células meristemáticas de alface (a) e cebola (b) tratadas com extrato aquoso de *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. (40 mg/mL), apresentando cromossomos perdidos (a) e micronúcleo (b) (400x).

Os dados da análise de variação, relativo a espécie medicinal *Lippia Alba* (Mill.) N.E. (sálvia), são apresentados na tabela A8 do Anexo. Esta análise mostrou que o

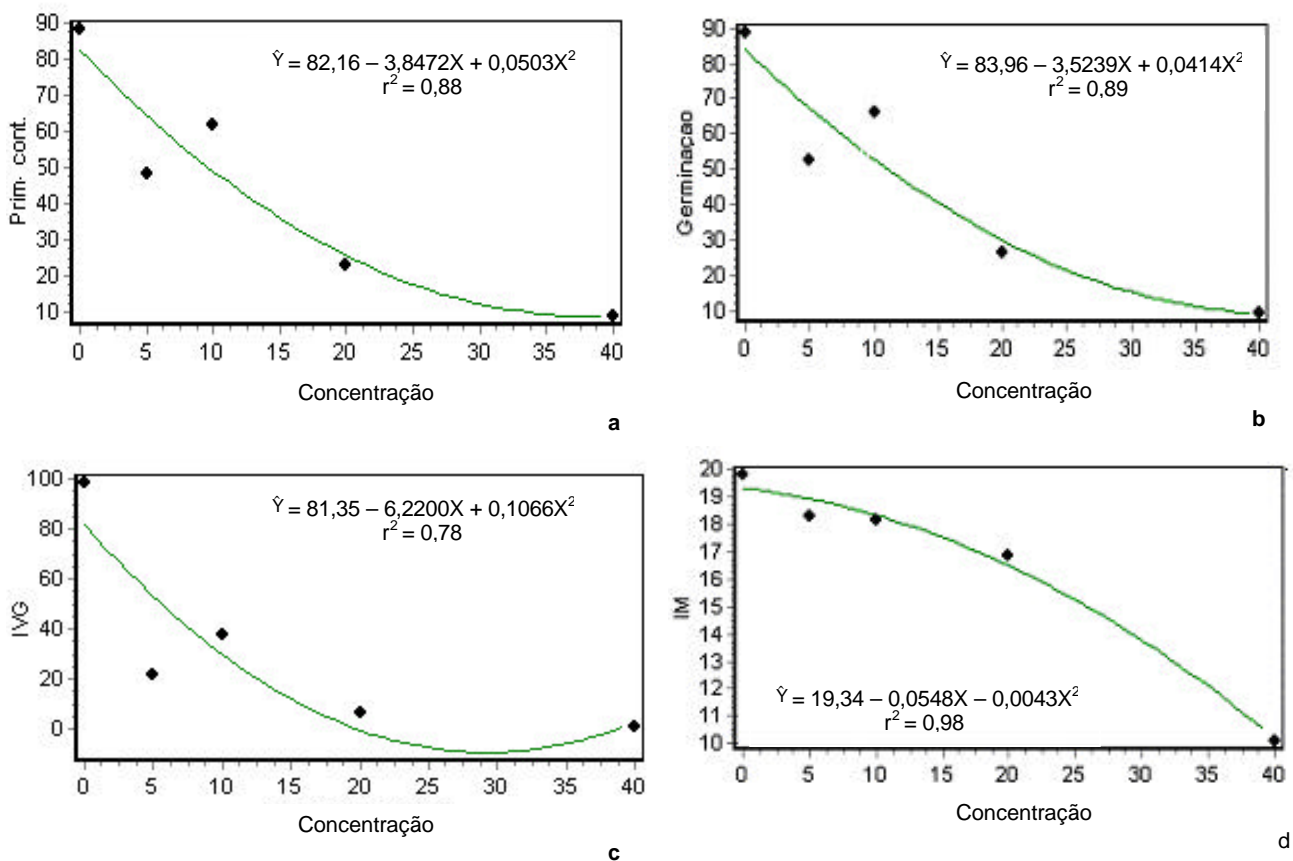
efeito principal dos Bioteste e a interação Bioteste x Concentração foram significativos, para todas as variáveis. A significância da interação justificando assim o estudo dos efeitos simples de cada um dos fatores dentro dos níveis do outro. Na tabela 8 são apresentados os resultados do teste de comparação de médias das duas espécies, dentro de cada nível do fator Concentração. Observa-se que as variáveis primeira contagem e germinação apresentam comportamento similar em todas as concentrações analisadas, ou seja, na concentração do controle a média da alface foi superiores às médias da cebola, na concentração de 5 mg/mL as médias dos biotestes não diferiram entre si e nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL as médias da cebola superaram as médias da alface. Com relação a variável IVG, observa-se que as médias da alface foram superiores as médias da cebola nas concentrações de 0 e 5 mg/mL, na concentração de 10 mg/mL as médias das espécies não demonstraram diferença entre si, nas concentrações de 20 e 40 mg/mL as médias da cebola foram superiores as médias da alface. No entanto, a variável IM não apresentou diferença entre as médias dos biotestes em quatro concentrações, apenas na concentração de 40 mg/mL, onde a média da cebola foi superior a média da alface.

**Tabela 8.** Médias das observações, por bioteste, dentro de cada nível do fator Concentração, para as variáveis Primeira contagem, Germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice miótico (IM), para a espécie *Lippia Alba* (Mill.) N.E Laboratório de Genética, UFPel, Pelotas, RS, 2005.

Concentração (mg/ml)	Bioteste	Num, obs,	Primeira contagem	Germinação	IVG	IM
0	Alface	4	87,97 a	88,57 a	98,50 a	19,82 a
	Cebola	4	67,36 b	69,68 b	25,66 b	18,48 a
5	Alface	4	61,51 a	66,11 a	38,05 a	18,19 a
	Cebola	4	66,70 a	68,51 a	23,30 b	18,24 a
10	Alface	4	48,02 b	52,81 b	22,03 a	18,32 a
	Cebola	4	61,63 a	65,39 a	21,04 a	18,27 a
20	Alface	4	22,81 b	26,53 b	6,76 b	16,90 a
	Cebola	4	61,83 a	67,18 a	20,33 a	17,83 a
40	Alface	4	8,85 b	9,65 b	1,02 b	10,10 b
	Cebola	4	58,18 a	66,68 a	19,68 a	16,92 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer ( $p \leq 0,05$ ).

Na figura 25, observa-se que houve uma relação quadrática para todas as variáveis com ponto de mínimo no intervalo entre 30 e 40mg/mL para a primeira contagem, percentagem de germinação e IVG (Figura 25a, b e c), e com ponto de mínima, na ausência do extrato de sálvia (Figura 25d), na variável IM, evidenciando assim um efeito alelopático e citotóxico do extrato de *Lippia alba* sobre sementes de alface. Esses dados acabam corroborando com Souza *et al* (2005), que avaliaram, em sementes de alface e de rúcula, as mesmas variáveis usadas neste trabalho, o efeito alelopático e citotóxico do extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim cidrão), espécie medicinal que apresenta os mesmos fitoquímicos encontrados em *Lippia alba*.

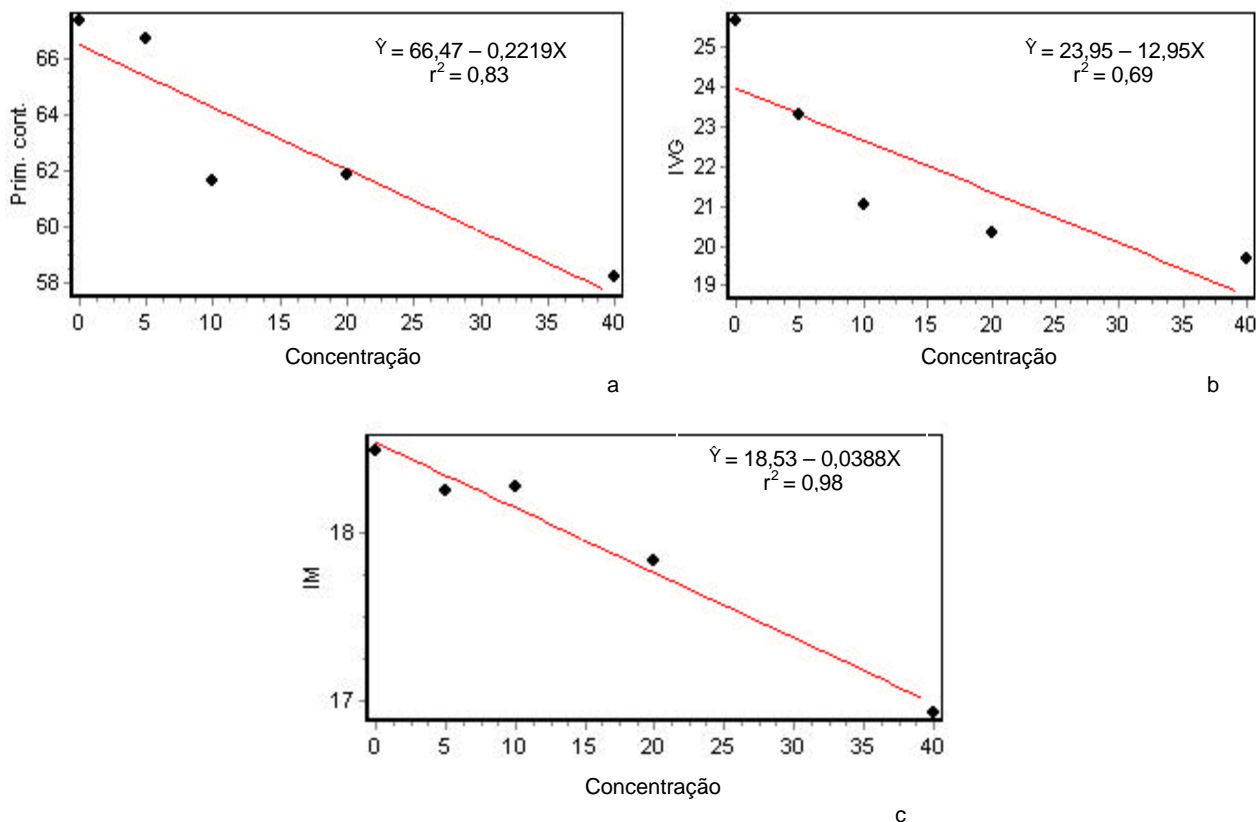


**Figura 25.** Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, germinação, (Índice de Velocidade de Germinação) IVG e (Índice Mitótico) IM para sementes de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Lippia Alba* (Mill.) N.E..

As análises de regressão entre concentração e as variáveis primeira contagem, IVG e IM para o bioteste cebola, cujos os resultados estão representados na figura 26, mostram uma relação linear negativa com as concentrações do extrato aquoso de sálvia. Dudai *et al.*, (1999), trabalhando com óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim cidrão), que apresentam também como componentes majoritários os mesmos monoterpenos encontrados em *Lippia alba*, observaram uma forte atividade inibitória sobre a germinabilidade e a velocidade de germinação de sementes de tomate. Segundo Simões (2003), a sálvia produz metabólitos secundários como monoterpenos, e citral com funções ecológicas conhecidas como inibidores de

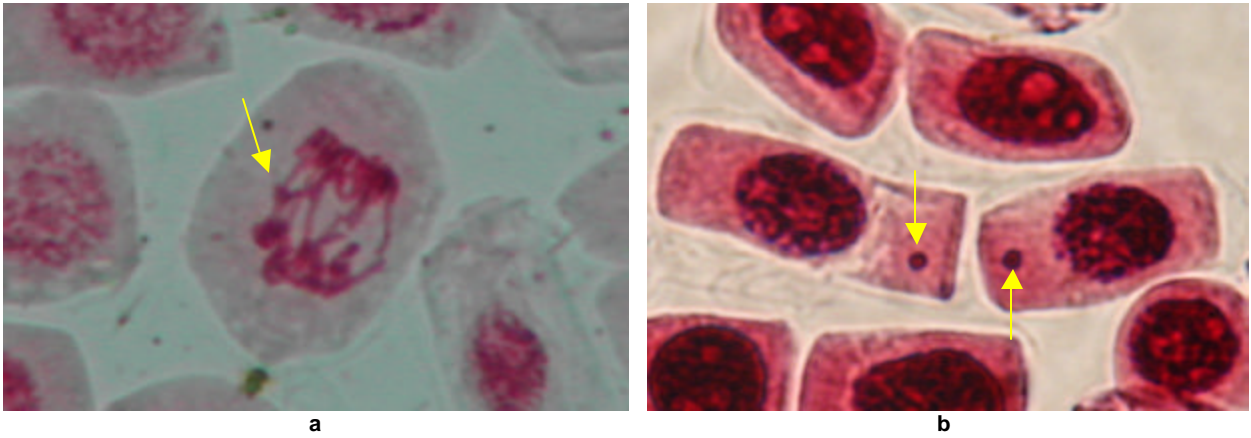


germinação e, freqüentemente, apresentam toxicidade elevada sendo geralmente dose dependente. A literatura apresenta também trabalhos que relatam o efeito inibitório de terpenos voláteis sobre a germinação de *Eucaliptus globus*, *Artemísia absinthium* entre outras. (ALMEIDA, 1993).



**Figura 26.** Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para as variáveis primeira contagem, (Índice de Velocidade de Germinação) IVG e (Índice Mitótico) IM para sementes de cebola tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Lippia Alba* (Mill.) N.E..

A concentração de 40 mg/mL do extrato aquoso de sálvia demonstrou efeito genotóxico sobre as células meristemáticas de cebola, evidenciando a presença de pontes anafásicas e de micronúcleos (Figura 27).



**Figura 27.** Células meristemáticas de cebola tratadas com extrato aquoso de *Lippia Alba* (Mill.) N.E.. (40 mg/mL), apresentando pontes anafásicas (a), e micronúcleos (b) (400x).

Pereira *et al.*, (2002), através do teste Smart verificaram a potencialidade genotóxica de *Hyptidendron canun*, espécie medicinal rica em monoterpenos e citral, mesmos compostos encontrados em *Lippia alba*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

- sementes de alface são mais sensíveis aos efeitos alelopático dos extratos aquosos das espécies medicinais analisadas, evidenciando-se assim, que essa espécie pode ser utilizada para monitorar a ação de substâncias derivadas de flavonóides, ácidos fenólicos, alcalóides, saponinas, taninos, cumarinas e terpenos voláteis.
- sementes de cebola podem se utilizadas para monitorar a atividade citotóxica e genotóxica de compostos derivados de cumarinas, taninos e terpenos, substâncias essas presente em grande quantidade em guaco, espinhiera santa, açoita cavalo e sálvia.

## 6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F.S.; A alelopatia em plantas. **IAPAR**, Curitiba, v.55, n.2, p.62-64, 1993.

ALVES, M C.S.; MEDEIROS-FILHO, S. INNECCO, R.; TORRES, S.B.; Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

ANAYA,A.L.;HERNÁNDEZ-BATISTA,B.E.;PELAYO-BENEVIDES,H.R.; CALERA, M.; FERNANDEZ-LUISELLI; E. **Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications**. Washington, American Chemical Society, p.224-241.1993.

BACKES, P.; IRGANG, B.; **Árvores do sul**. Porto Alegre-RS. Instituto Souza Cruz. 2003. 326p

BECKER, H.J.; Mitotic recombination. **The genetics and biology of *Drosophila***, p.1019-1087, 1986.

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

BÉRENGER, A.L.R. Farmacologia e etnofarmacologia da família *Celastraceae*. In. **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Anais. p.13.1996.

BUTTOW, M.V.; STEIN, V.C.; VARGAS, D.P.; HEIDEN, G.; IGANCI, J.R.V.; BOBROWSKI, V.L. Efeito de infusões de pata de vaca e aroeira mansa células meristemáticas de *Allium cepa*. In. **XII Congresso de Iniciação Científica-UFPel 2004**, CD-ROM.

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

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, M.; **Fitoterapia**, v.58, p.71, 2000.

CATTELAN, L.V.; STEIN, V.C., SOUZA, S.A.M.; IGANCI, J.R.V.; BOBROWSKI, L.V.; ROCHA, B.H.G. Avaliação da fitotoxicidade de *Rosmarinus officinalis* L. In. **VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. Natal-RN, 2005, Anais, p119.

CARVALHO, G.J.; ANDRADE, L.A.B.; GOMIDE, M.; FIGUEIREDO, P.A.M. Potencialidades alelopáticas de folhas verdes de cana-de-açúcar em diferentes

concentrações de matéria seca na germinação de sementes de alface. **Ciências**. Marília-SP, v.5, n.2, p.19-24, 1996.

CASTRO, P.R.C.; RODRIGUES, J.D.; RONDELLA-MAIMONI, R.C.S.; RABELO, J.C.; VEIGA, R.F.A. ; LIMA, G.P.P.; JUREIDINI, P.; DENADAI, I.A.M. Ação alelopática de alguns extratos de plantas daninhas na germinação de arroz. **Anais Escola Superior Luiz de Queiroz**, n.41, p.369-381, 1984.

CASTRO, P.R.C.; RODRIGUES, J.D.; MORAES, M.A. & CARVALHO, V.L.M. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). **Planta Daninha**, n.6, p.79-85, 1983.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**. v.3, n.12, p.24-26, 2000.

CHOU, C.H.; KUO, Y.L.. Allelopathic exclusion of understory by *Leucena leucocephala* (Lam.). **Journal of Chemical Ecology**, v.12, n.1, p.1434-1448, 1986.

COELHO, R.W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim annoni. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.21, p.255-263, 1986.

COUTINHO, L.M.; HASHIMOTO, F. Sobre o efeito inibitório de sementes produzido por folhas de *Calea cuneifolia* DC. **Ciência e Cultura**, n.23, p.759-764, 1971.

DUDAI, N.; POLJAKOFF, A.M.; MAYBER, A.M.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H.R. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**. v.25, n.2, p.1079-1789. 1999.

FALEIROS, I.C.F. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa). **XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Curitiba. p-42. 1992.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A.; Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo. v.12, n.1, p.175-204. 2000.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F.; **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 520p. 2004.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) **Drosophila. Mutation Research**, v.334, p.247-258, 1995.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **ACTA Botânica Brasílica**, v.18, n.3, p.459-472. 2004.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. São Paulo. Guanabara-Koogan. 7ed. 2002. 794p.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, Funpec, 131p.2002.

GUZMÁN-RINCÓN, J.;GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: **Butterworth et al. (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change**. Plenum Press: New York.p. 169-181.1995.

HENRIQUES, J.AP.; VALSA, J.O, GOMES, R.A.; Utilização de testes de microrganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente mutagênicas. In: PINTO, S.O C.(ed) **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo, Manole, p.330-350. 1987.

HUGGET, A.C.; SCHILTER, B.; ROBERFROID, M.; ANTIGNAC, E.; KOEMAN, J. H. Comparative methods of toxicity testing. **Food. Chem. Toxic.** n.34, p183-92,1996.

ISTA. **Handbook of variety testing**. Zurich, 1992, 44p.

ITOKAWA, H. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**.Oxford p.3713-3716.1991.

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil**, São Paulo, Plantarum, 512p.2002.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. WinStat - Sistema de Análise Estatística para Windows. Versão Beta. Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MALLIK, A.V. Possible role of allelopathy in growth inhibition of softwood seedlings in Newfoundland. **Allelopathy; Basic and applied aspects**.London, Chapman & Hall, p.321-340.1992

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnologia para o cultivo de espinheira santa. **CPQBA-UNICAMP**. Campinas-São Paulo. RZM, 12p.2002.

MARTINS, R. E.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E.; **Plantas Medicinais**. Viçosa-Minas Gerais. UFV. 220p. 1998.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato aquoso de cravo-da-india e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MEDEIROS, A.R.M.; Alelopatia: importância e suas aplicações. **Horti Sul**. Curitiba v.1, n.3, p.27-32,1990.

MEDEIROS, A.R.M. & LUCCHESI, A.A. Efeitos alelopáticos de ervilhaca (*Vicia sativa*) sobre a alface em testes de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28,p.9-14, 1993.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie**. Jena, Fischer. 1937.

NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A.; Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo. v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NUNES, A.P.M.; ARAUJO, A.C.; Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. **X Semana de Iniciação Científica da UERJ**, Rio de Janeiro, 2003. Anais. p.15.

OLIVEIRA, A.B. Efeito de substâncias isoladas do extrato aquoso das folhas de *Maytenus ilicifolia* M. (Espinheira Santa) sobre a secreção gástrica de ácido. **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Curitiba-Paraná. p.55.1992.

PEREIRA, D.G.; CARVALHO, S.; FONSECA, C.A. Verificação do potencial genotóxico de *Hyptidendron canun* em células germinativas de *D. melanogaster*, através do teste Ring-x-loss. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**. v.5, n.29, p.32-40. 2002.

PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; PEREIRA, I.A.; OLIVEIRA, R.S.; FARIA, T.C.L. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola**. São Paulo. v.58, n.1, p. 61-65, 2001.

PINHO, D.; TEDESCO, G.; MAYER, P.; STURBELLE, R.; MARTINO-ROTH, M.G.; GALHO, A.; DODE, L.; OLIVEIRA, M.; GARCIAS, G. Avaliação da mutagenicidade do chá de carqueja *Baccharis trimera* L. em teste de *Allium cepa*. In. **VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. Natal-RN, 2005, Anais, p.70.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília Agiplan. 1977. 289p.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA, I.A.; MAGALHÃES, P.C.; Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.909-914, 2001.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.P.R.; MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto-SP, v.1, 1991, 246p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.E.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. São Paulo. Guanabara-Koogan, 2001. 906p.

REIGOSA, M.J.; SÁCHES-MOREIRAS, A.; GONZALES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**. v.18, n.5, p.577-608, 1999.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K., **Mutagênese ambiental**. Canoas-RS, ULBRA, 2003.356p.

RIETVELD, W.J.; SCHLESINGER, R.C.; KESSER, K.J. Allelopathic effects of black walnut on European black alder coplanted as a nurse species. **Journal of Chemical Ecology**, n.9, p.1119-1133, 1983.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2<sup>nd</sup> ed, New York, Academic Press, 1984.

RICE, E.L.. Allelopathic effectson nitrogen cycling. **Allelopathy: Basic and applied aspect**. London, Chapman & Hall. p.31-58. 1992.

RICHARDSON, D. R., WILLIAMSON, G. B. Allelopathic effects of shrubs of the sand pine scrub on pines and grasses of the sandhills. **Forest Science**, v.34, n.1, p.592-596, 1988.

RIZVI, S.J.H. & RIZVI, V. Explotation ofallelochemicals in improving crop productivity. **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall, p.443-472, 1992.

RODRIGUES, F.C.M.P.; LOPES, B.M.; Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro. v.8, n.1, p.130-136, 2001.

RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras** Jaboticabal-SP, FCAVJ-UNESP.1992. 160p.

ROLLA, H.C. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sendimento do Rio Guaíba e lodo proveniente da industria de papel e celulose. **Tese de mestrado**, UFRGS-Porto Alegre, 1995. 77p.

ROSA, S.G.T. Germinação de sementes de espécies medicinais da flora do Rio Grande do Sul. **Tese de Doutorado**. UFRGS-Porto Alegre. 2000.140p.

ROSA, S.G.T; FERREIRA, A.G.; Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botânica Brasílica**. São Paulo. v.15, n.2, p.147-154, 2001.

SHIROTA, O. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**. v.57, n.12, p1675-1681, 1994.

SILVA, F.M.; Verificação da eficácia dos bioensaios com extratos aquosos no diagnóstico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras.**Tese de Mestrado**, UFRGS-Porto Alegre, 2004. 142p.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, 2003. 422p.



SILVA, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**. São Paulo. v.25, n.3, p449-454, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. UFRGS. Porto Alegre-Rio Grande do Sul. 212p. 1986

SIMÕES, C.M.O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically, **Fitoterapia**, n.59, v.2, p281-293, 1988.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 821p.

SOUZA, S.A.M.; STEIN, V.C.; CATTELAN, L.V.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA, B.H.G.; Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Belo Horizonte. v.5, n.1, p.3-9, 2005.

TEIXEIRA, R.O. E VICENTINI, V.E.P. Estudo da mutagenicidade de plantas In. **43º Congresso Brasileiro de Genética**, Ribeirão Preto-SP, 1997. Anais. p.115.

TAYLOR, R.J. & SHAW, D.C. Allelopathic effects of *Engelmann spruce* bark stilbenes and tannin-stilbene combinations on seed germination and seedling growth of selected conifers. **Canadian Journal of Ecology**, n.61, p.279-289, 1983.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor de sementes**. São Paulo. Funep, 1994. 164p.

VOGEL, E.W.; SZAKMARY, A.; Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila melanogaster* **Mutagenesis** v.3, n.2, p.161-171, 1987.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó-SC, Argos, 2001, 120p.

WALLER, G.R.; KUMARI, D.; FRIEDEMANN, J.; FRIEDEMANN, N.; CHOU, C.H. **Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica* L.** New York, John Wiley & Sons. p.243-269. 1986.