

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

**POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO
DOS EXTRATOS DE *Echinodorus grandiflorus* E
Sagittaria montevidensis (ALISMATACEAE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula Durand Coelho

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DOS
EXTRATOS DE *Echinodorus grandiflorus* E *Sagittaria
montevidensis* (ALISMATACEAE)**

Ana Paula Durand Coelho

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

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

Coelho, Ana Paula Durand

Potencial genotóxico e antiproliferativo dos extratos de *echinodorus grandiflorus* e *sagittaria montevidensis* (alismataceae) / Ana Paula Durand Coelho.-2013.

57 p.; 30cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2013

1. Plantas medicinais 2. Genotoxicidade 3. Antimutagênico. Flavonóides 4. Chapéu-de-couro. Falso chapéu-de-couro 5. *Allium cepa*. I. Tedesco, Solange Bosio II. Título.

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

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

**POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DOS
EXTRATOS DE *Echinodorus grandiflorus* E *Sagittaria
montevicensis* (ALISMATACEAE)**

elaborada por
Ana Paula Durand Coelho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Bosio Tedesco, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)

Ionara Fátima Conterato, Dr^a. (FEPAGRO)

Santa Maria, 18 de Fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Cleci Durand Coelho (in memorian), por toda dedicação que me foi dada. E que mesmo não estando presente fisicamente em minhas conquistas, esteve, está e estará em meu pensamento e coração.

Ao meu pai, Alberto R. L. Coelho, que nos últimos anos se tornou um grande “pai-mãe” dedicado e atencioso.

Às minhas irmãs, em especial a “ermã-menor” Raquel D. Coelho por ser meu lado forte sempre.

E por último, mas não menos importante, à minha Tia-avó Edith Duarte Centeno (in memorian), minha alfabetizadora e que sempre foi mais que uma tia.

“sem amor eu nada seria...”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Professora Orientadora Solange Bosio Tedesco, por ter me dado essa grande oportunidade, que agarrei com unhas e dentes. Por me ensinar a pensar positivamente e que o sucesso absoluto é só questão de tempo e dedicação. Espero ter atingido todas as expectativas, muito obrigada pela dedicação e amizade.

Aos meus pais, Cleci (*in memorian*) e Alberto, que sempre foram incentivadores e investidores de meus estudos. E o amor deles me fez chegar até esse momento.

À professora Thais Scotti do Canto Dorow pela dedicação e realização das coletas e identificação das espécies.

À minha tia-avó (*in memorian*), pelo carinho, cuidado e torradas feitas para acompanhar os meus estudos, enquanto estava presente.

A todos os colegas do Labcitogen, pelas tardes de análises, papos e algumas risadas. Em especial a Viviane, pelas ajudas, tiradúvidas, material emprestado, amizade e companheirismo. As garotinhas, Marília e Andrielle, a Kássia e Leonardo. Meus dias de trabalho, nunca foram trabalhosos, pela presença de vocês.

À minha grande amiga, Andrea, pelos grandes papos que temos, pela ajuda na correção ortográfica desse trabalho, pela amizade. Valeu, valeu!

À minha avó de coração, Nemora, pelo carinho, conversas e algumas tardes de mate.

E a todos que de alguma forma, fizeram parte dessa conquista.

Muito Obrigada!

**“O sucesso nasce do querer,
da determinação e
persistência em se chegar a
um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca
e vence obstáculos, no
mínimo fará coisas
admiráveis.”
José de Alencar**

RESUMO

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

POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DOS EXTRATOS DE *Echinodorus grandiflorus* E *Sagittaria montevidensis* (ALISMATACEAE)

AUTORA: ANA PAULA DURAND COELHO
ORIENTADOR: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2013.

No Brasil, o potencial econômico de germoplasma de espécies medicinais é uma riqueza a ser preservada e utilizada, tornando-se cada vez mais uma forma de terapia alternativa acessível para o uso da população. No entanto, o uso indiscriminado e sem controle pode causar mais danos à saúde do que benefícios, sendo importante o conhecimento dessas plantas, desde os níveis celulares bem como ação sobre os organismos vivos. As espécies medicinais *Echinodorus grandiflorus* e *Sagittaria montevidensis* pertencem à família Alismataceae, conhecidas respectivamente como chapéu-de-couro e falso chapéu-de-couro. Para *E. grandiflorus* é atribuído potencial medicinal como ações depurativa, diurética, antiinflamatória, antiofídica e antirreumática, sendo as folhas a principal parte utilizada da planta, seja na forma de chá ou infusão. *S. montevidensis* não apresenta suas propriedades medicinais conhecidas e tendo uma grande variedade morfológica das folhas, isso leva a população a confundi-la com “chapéu-de-couro”. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o potencial genotóxico e antiproliferativo de extratos das folhas secas de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*, sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, bem como realizar análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para quantificação dos compostos dos extratos. O sistema teste *A. cepa* é bem aceito para a análise da genotoxicidade, sendo validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS), podendo vir a alertar sobre possíveis danos que substâncias podem causar aos organismos a elas expostos. Para o teste foi coletado material vegetativo no habitat natural no Rio Grande do Sul, nos municípios de: Santa Maria, São Sepé, Silveira Martins e Pinhal Grande e na forma comercializada de *E. grandiflorus*, separados em 2 grupos experimentais. Os extratos preparados, por infusão de 15 min. das folhas secas, em duas concentrações 6g. L^{-1} e 24g.L^{-1} , para cada espécie e 2 controles, água (controle negativo) e o glifosato 15% (controle positivo). A análise cromatográfica (HPLC-DAD) revelou a presença de flavonóides e ácidos fenólicos para ambas as espécies. Sendo, maiores teores de ácido cafeico e flavonóide glicosídeo em *E. grandiflorus* e glicosídeo fenol em *S. montevidensis*. Este estudo mostrou que os extratos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* apresentam potencial genotóxico e quando usadas em elevadas concentrações, potencial antiproliferativo.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Genotoxicidade. Antimutagênico. Flavonóides. Chapéu-de-couro. Falso chapéu-de-couro. *Allium cepa*.

ABSTRACT

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

POTENTIAL GENOTOXICITY AND ANTIPROLIFERATIVE OF EXTRACTS *Echinodorus grandiflorus* AND *Sagittaria montevidensis* (ALISMATACEAE)

AUTHOR: ANA PAULA DURAND COELHO
ADVISOR: SOLANGE BOSIO TEDESCO
Santa Maria February 18, 2013.

In Brazil, the economic potential of the germplasm of medicinal species is a treasure to be preserved and utilized, increasingly becoming a form of alternative therapy available for the population to use. However, the indiscriminate and uncontrolled use can, cause more harm than benefits to health and it is important to understand these plants, from cellular levels and the action on living organisms. The medicinal species *Echinodorus grandiflorus* and *Sagittaria montevidensis* belong to the family Alismataceae, known respectively as “leather hat” and “false leather hat” in Brazil. For *E. grandiflorus* the attributed medicinal potentials are depurative, diuretic, anti-inflammatory, antiophidic and anti-rheumatic action, were leaves are the main part of the plant used, either as a tea or infusion. *S. montevidensis* has no known medicinal properties and having a wide range of leaf morphologies, leading to population confused with “leather hat”. The present study evaluated the genotoxic and antiproliferative extracts of the dried leaves of *E. grandiflorus* and *S. montevidensis* using the cell cycle of *Allium cepa*, and performing analysis by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) for the quantification of the extracts of the compounds. The test system is well suited for the analysis of genotoxicity, being validated by the International Programme on Chemical Safety (IPCS, WHO) and can alert on the possible damages that can be caused to organisms exposed to the substances in the plants. For the test, plant material was collected in the field in Rio Grande do Sul, in the municipalities of: Santa Maria, São Sepé, Silveira Martins and Pinhal Grande and in the commercial form of *E. grandiflorus*, separated into two experimental groups. The extracts were prepared, by infusing dry leaves for 15 min., at two concentrations, 6g.L⁻¹ e 24g.L⁻¹, and two controls, water (negative control) and glyphosate 15% (positive control). The chromatographic analysis (HPLC-DAD), revealed the presence of flavonoids and phenolic acids for both species, higher concentrations of caffeic acid and flavonoid glycoside in *E. grandiflorus* and phenol glycoside in *S. montevidensis*. This study showed that extracts of *E. grandiflorus* and *S. montevidensis* show genotoxic potential and when used in high concentrations, antiproliferative potential.

Keywords: Medicinal plants. Genotoxicity. Antimutagenic. Flavonoids. Leather hat. False leather hat. *Allium cepa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Folha (A), inflorescência (B) e flor (C) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli.	17
Figura 2-	Inflorescência e parte aérea de <i>Sagittaria montevidensis</i> Cham. & Schlecht.....	19
Figura 3-	Bulbos de cebola em contato com as infusões das espécies estudadas:.....	26
Figura 4-	Células de <i>Allium cepa</i> em diferentes fases da divisão celular:	37
Figura 5-	Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão das folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (a) e <i>Sagittaria montevidensis</i> (b), detecção UV a 325 nm, grupo 1.....	39
Figura 6-	Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão das folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (a), <i>E. grandiflorus</i> "comercial" (b) e <i>Sagittaria montevidensis</i> (c), detecção UV foi a 325nm, grupo 2.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número de células em interfase, número de células em divisão e índice mitótico.	36
Tabela 2-	Número de células em divisão, número e tipos de aberrações celulares e número total de células irregulares	38
Tabela 3-	Compostos fenólicos e flavonóides de <i>Echinodorus grandiflorus</i> e <i>Sagittaria montevidensis</i> , população 1.....	40
Tabela 4-	Compostos fenólicos e flavonóides de <i>Echinodorus grandiflorus</i> e <i>E. grandiflorus</i> “comercial”, população 2.	41
Tabela 5-	Compostos fenólicos e flavonóides de <i>Sagittaria montevidensis</i> , população 2.....	41
Tabela 6-	Porcentagem dos compostos fenólicos e flavonóides de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , <i>E. grandiflorus</i> “comercial” e <i>Sagittaria montevidensis</i> , população 2.....	42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Família Alismataceae	15
1.1.1 Gênero <i>Echinodorus</i>	16
1.1.1.1 <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltl.) Micheli.....	16
1.1.2 Gênero <i>Sagittaria</i>	18
1.1.2.1 <i>Sagittaria montevidensis</i> Cham. & Schlecht.....	18
1.2 Teste <i>Allium cepa</i> L.	20
1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Material	24
2.2 Métodos	24
2.2.1 Preparo dos extratos	25
2.2.2 Sistema teste vegetal “in vivo”: Ação dos extratos sobre a divisão celular das radículas de cebola	25
2.2.3 Análise dos chás por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	27
2.2.3.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais	28
2.2.3.2 Quantificação dos compostos por meio de CLAE-DAD.....	28
2.2.4 Análise Estatística	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Resultados	30
3.1.1 Sistema-teste <i>Allium cepa</i>	30
3.1.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
3.2 Discussão	42
3.2.1 Sistema-teste <i>Allium cepa</i>	42
3.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
4 CONCLUSÃO	47
5 BIBLIOGRAFIA	48

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com objetivo medicinal vem sendo utilizado pelas populações desde os primórdios da civilização. São consideradas plantas medicinais as espécies vegetais que produzem algum princípio ativo utilizado para o tratamento de doenças, fornecendo material para tratamentos fitoterápicos através de folhas, flores, frutos, cascas, raízes entre outros, dos quais são preparados chás e outras formas de medicamentos.

Nos últimos tempos, o uso de plantas medicinais, prática tradicional ainda existente entre os povos de todo o mundo, tem recebido incentivos da Organização Mundial de Saúde, sendo um dos principais motivos para o desenvolvimento desta prática, fatores econômicos e sociais (MARTINS *et al.*, 1995; FRESCURA, 2012).

No Brasil cerca de 80% da população utilizam como fonte de recurso terapêutico produtos de origem natural, principalmente plantas medicinais (DI STASI, 1996). Elas servem como uma forma de terapia alternativa e acessível para a população, fazendo com que seja necessária a sua preservação, devido ao seu potencial econômico. Para isso é essencial conservar a diversidade genética vegetal, com pesquisas para a caracterização dessas plantas, desde níveis biológicos a agrônômicos.

No Rio Grande do Sul, as plantas medicinais são muito utilizadas na medicina popular, sendo algumas vezes, a única fonte de medicação que a população tem acesso (FACHINETTO & TEDESCO, 2009). Porém, em muitos casos, devido à falta de informação e ao uso indiscriminado, tal costume pode causar mais danos à saúde que benefícios; daí a importância do conhecimento do potencial genotóxico dessas plantas. Muitos compostos que fazem parte da composição química das plantas utilizadas como medicinais podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, quando ingeridos de forma indiscriminada.

Devido à presença dessas substâncias nos chás, são necessários trabalhos que envolvam a genotoxicidade e o efeito antiproliferativo de plantas medicinais, observando possíveis e eventuais danos causados a organismos alvo.

Estudos de potencial genotóxico têm sido bastante utilizados pela sua rapidez, baixo custo e confiabilidade nos resultados. A genotoxicidade ocorre

quando a capacidade de replicação e de levar informação do DNA é alterada, podendo resultar em efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Os principais tipos de genotoxicidade se dão por danos no DNA, mutações pontuais e aberrações cromossômicas.

Para isso são utilizados testes que servem como biomarcadores, os quais são úteis e podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico (SILVA *et al.*, 2003). O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células, o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa* L. (GADANO *et al.*, 2002).

Foi relatado por Vicentini *et al.* (2001), que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Entretanto, o consumo de chás pela população pode suprimir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano (SILVA *et al.*, 2004).

Sistemas testes vegetais, principalmente o de *A. cepa*, têm sido utilizados para o estudo preliminares dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção do potencial de genotoxicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2003; FACHINETTO *et al.*, 2007; FRESCURA, 2012), servindo como primeira triagem de detecção. O uso de raízes de *A. cepa* em biomonitoramento permite uma resposta rápida e segura, revelando o efeito danoso sobre o mecanismo reparador de DNA (DIANA *et al.*, 2000).

A eficiência do sistema *A. cepa* se deve as suas características cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio, por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e tamanho grande (FISKEJO, 1994; MITTEREGGER-JÚNIOR *et al.*, 2006; CARITÁ & MARIN-MORALES, 2008).

O método de avaliação, sistema *A. cepa*, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA *et al.*, 2004; FACHINETTO *et al.*, 2007).

Estudos sobre o potencial de genotoxicidade de extratos de plantas medicinais devem ser priorizados, pois dessa maneira estarão sendo investidos

esforços de pesquisa visando à saúde da população, podendo alertar sobre possíveis e eventuais danos.

O presente estudo visou avaliar a existência de genotoxicidade nos extratos de populações de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schtdl.) Micheli¹ e *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht., em diferentes concentrações e comparação desses efeitos entre populações coletados em localidades diferentes, bem como, realizar a análise cromatográfica dos extratos para obtenção de dados referentes à composição fitoquímica das espécies. As espécies foram escolhidas devido às semelhanças morfológicas de suas folhas e a possibilidade da população confundilas, pois *E. grandiflorus* é utilizada como planta medicinal e *S. montevidensis* não apresenta seu uso reconhecido.

São escassos os estudos sobre a toxicidade dessas espécies, considerando todas as substâncias presentes nas mesmas, portanto indica-se a necessidade de pesquisas que promovam o conhecimento do seu potencial de genotoxicidade.

Essa avaliação se deu através da observação da inibição da divisão celular e alterações morfológicas celulares bem como danos cromossômicos em *A. cepa*, submetidas aos extratos, servindo como indicativo de possíveis danos a outros tipos celulares, principalmente células humanas.

Para complementar a análise de genotoxicidade foram realizadas análises cromatográficas, para obtenção de dados referentes à composição fitoquímica das espécies.

¹ Na literatura foram encontradas outras formas de autoria para a espécie *E. grandiflorus*, sendo utilizado, no presente trabalho, a mais corriqueira.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Família Alismataceae

A família Alismataceae é constituída por espécies arbóreas adaptadas a locais úmidos e semi-sombreados, pertence à classe das Liliopsida, correspondendo, em número de espécies, a segunda maior classe das angiospermas (CRONQUIST, 1988) e podem ser encontradas praticamente em qualquer região do mundo. Apresenta cerca 16 gêneros e de 100 espécies, com distribuição cosmopolita (ANDRADE *et al.*, 2007). Dentre seus gêneros, *Echinodorus* e *Sagittaria* possuem as maiores diversidades específicas, apresentando 45 e 35 espécies, respectivamente (JUDD *et al.*, 2008).

Essa família reúne ervas aquáticas, parcialmente submersas, com folhas alternas espiraladas (SOUZA & LORENZI, 2005), sendo encontradas frequentemente em lagos, pântanos, rios e córregos de água doce. A maioria das espécies é caracterizada por plantas com raízes fixadas na água ou em brejos e apresentam folhas eretas ou flutuantes, sendo halófitas ou hidrófitas (HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1998).

Estudos fotoquímicos sobre Alismataceae (LAINETTI & BRITO, 1980; MARTINS *et al.*, 1995), encontraram entre os principais constituintes químicos: taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais. Suas espécies são usadas como fontes de alimentos e de fitoterápicos e na ornamentação de aquários e lagoas.

No Brasil e no Rio Grande do Sul existem dois gêneros de ocorrência espontânea: *Echinodorus* e *Sagittaria*.

1.1.1 Gênero *Echinodorus*

A família Alismataceae apresenta entorno de 18 espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* no Brasil, sendo um dos gêneros mais representativos em Alismataceae (COSTA *et al.*, 2006). O gênero é constituído por espécies aquáticas e pantaneiras, que crescem ocasionalmente submergidas, mas apresentam folhas e inflorescência predominantemente emersas, ou seja, são halófitas (HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1986).

Entre as espécies, *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* Mich. possuem propriedades medicinais semelhantes e, popularmente, são denominadas de “chapéu de couro” (DUTRA *et al.*, 2006). Várias espécies de *Echinodorus* são utilizadas na medicina popular, entre elas: *E. grandiflorus*, *E. paniculatus* Mich., *E. argentinensis* Rataj. e *E. macrophyllus* (REGO, 1988).

1.1.1.1 *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli.

Echinodorus grandiflorus (Figura 1) é uma espécie herbácea ou subarborescente aquática, perene, acaule e rizomatoso, sendo encontrada em mananciais aquáticos ou cultivada para fins medicinais (LORENZI, 2000a; LORENZI & MATOS, 2002).

A planta possui folhas grandes, longo-pecioladas e de consistência coriácea. A forma da folha, no entanto, é bastante variada, de ovada a cordiforme (CORREA JR *et al.*, 1991; SILVA JR *et al.*, 1994; HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1994). Bevilaqua *et al.* (2001) concluíram que a espécie é predominante no Rio Grande do Sul.

Tradicionalmente é empregada no tratamento das mais diversas patologias (LORENZI & MATOS, 2002).

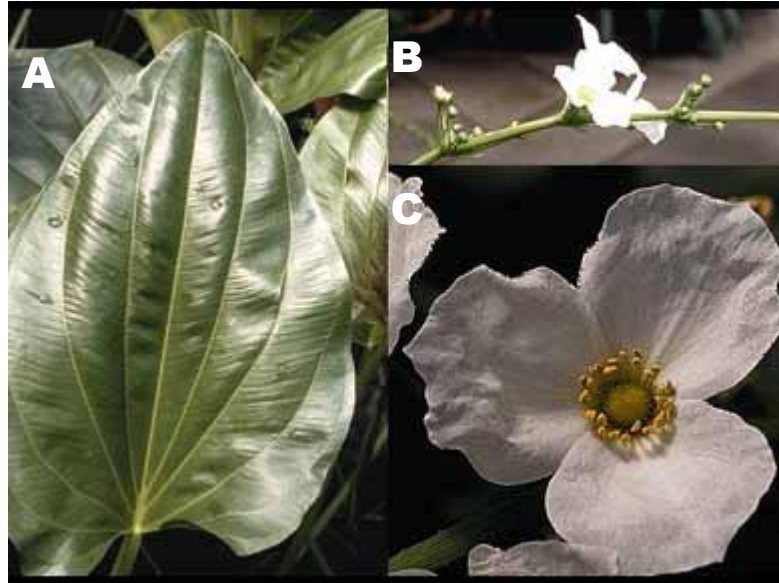


Figura 1 – Folha (A), inflorescência (B) e flor (C) de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schtdl.) Micheli.

Fonte: <http://wildplants.net/Ee/Echinodorus%20grandiflorus.jpg>

Chapéu-de-couro (*E. grandiflorus*) é uma planta de grande expressão na medicina popular usada, principalmente, como antiinflamatória, laxativa, adstringente, antirreumática, eliminadora do ácido úrico e ação depuradora (CORREA, 1984 e SILVA-Jr. *et al.*, 1994).

Extrato das folhas tem sido utilizado em diversas pesquisas para demonstrar seus efeitos antiinflamatório (DUTRA *et al.*, 2006), vasodilatador (ALMEIDA *et al.*, 2001; 2003) e anti-hipertensivos (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Em estudo realizado por Lessa *et al.* (2008), extratos etanólicos de *E. grandiflorus* injetados (em doses crescentes de 300-1000 mg/kg) em ratos hipertensos, mostrou um efeito anti-hipertensivo significativo comparado com as drogas anti-hipertensivas de referência utilizadas no tratamento da hipertensão arterial. O estudo de Dutra *et al.* (2006) indicou que o extrato metanólico de *E. grandiflorus* possui propriedades analgésicas sobre o sistema nervoso periférico e central.

Em algumas regiões a espécie é utilizada na fabricação de bebida refrescante, como componente do produto “Mineirinho[®]”, industrializado pela empresa “Refrigerantes Flexa Ltda.”, com ampla área de cultivo em Tanguá-RJ, e de outro refrigerante chamado “Mate Couro[®]”, produzido em Belo Horizonte-MG (PIMENTA, 2002; DE LUCA, 2003; LIMA, 2006; BRUGIOLO, 2010).

A espécie tem sido muito estudada, descrevendo-se principalmente o isolamento de ácidos graxos, diterpenos, triterpenos e esteroides (TANAKA, 2000). De acordo com Correa Junior *et al.* (1991), os principais grupos de princípios ativos identificados na planta são alcalóides, glicídios, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos.

E. grandiflorus se encontra descrita na Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010).

1.1.2 Gênero *Sagittaria*

O gênero *Sagittaria* (Alismataceae) compreende 25 espécies de plantas herbáceas aquáticas que são distribuídas em todas as Américas, em regiões tropicais. Nenhuma evidência foi encontrada para o uso de *Sagittaria montevidensis* na medicina tradicional. No entanto, outras espécies de *Sagittaria* são conhecidas por produzirem compostos antibacterianos (TANAKA *et al.*, 2010).

É encontrado no Brasil, contendo as espécies *S. guyanensis* Kunth, *S. lancifolia* L., *S. rhombifolia* Cham. e *S. montevidensis* (POTT & POTT, 2000).

As plantas do gênero *Sagittaria* apresentam três padrões básicos de folhas, conforme sejam imersas, flutuantes ou emersas. Dentro desses padrões há grande variabilidade, mesmo dentro da mesma espécie.

1.1.2.1 *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht

S. montevidensis conhecida como Sagitária (Figura 2), aguapé de flecha ou falso chapéu-de-couro, é uma planta aquática encontrada frequentemente em lavouras de arroz irrigado cultivadas no sistema pré-germinado no Sul do Brasil e em outros locais do mundo. Esta planta também vegeta em canais e em reservatórios de água onde pode atingir até 1,5 m de altura (ANDRADE *et al.*, 2007). Sagitária é uma planta perene que se reproduz por sementes e tubérculos, com folhas e caule laticíferos e grande variabilidade morfológica (LORENZI, 2000b). Desenvolve-se

principalmente em água estagnada e poluída, servindo, portanto, de indicadora de ambiente antropizado e água eutrofizada onde as plantas alcançam seu maior desenvolvimento vegetativo e apresentam um grande número de flores (POTT & POTT, 2000).



Figura 2 – Inflorescência e parte aérea de *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht.

Fonte: http://www.flickr.com/photos/chdeff_photos/4914952253/, <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-malezas/sagittaria-montevidensis-02.jpg>

Segundo Rego (1988), *S. montevidensis* apresenta alta diversidade de formas foliares e tamanhos, sendo a única do gênero de folhas emersas e sagitadas no Rio Grande do Sul.

Estudo realizado por Comiotto (2006), sobre a influência de extratos aquosos de *Echinochloa cruzgalli* L., *Cyperus sp.* e *S. montevidensis* sobre a qualidade fisiológica das sementes e crescimento de plântulas de arroz cv. Atalanta. Evidenciou que as diferentes espécies apresentaram fitotoxicidade diferencial, negativa ou positiva, das substâncias alelopáticas, dependendo da concentração e da característica analisada. Nesse estudo, os extratos de *S. montevidensis* interferiram no crescimento da parte aérea e das raízes das plântulas de arroz.

Segundo Correa (1984), o gênero *Sagittaria* possui propriedades medicinais e popularmente é conhecida como chapéu-de-couro e as folhas são consumidas com propriedades idênticas as de *Echinodorus*, porém as propriedades medicinais de *S. montevidensis* não são conhecidas.

São escassos os estudos sobre a toxicidade de espécies vegetais, como *S. montevidensis*. Considerando as substâncias presentes no gênero *Sagittaria* e pela

característica da espécie em apresentar uma grande variabilidade morfológica e possuir características fenotípicas muito semelhantes com *E. grandiflorus*, a espécie tem sido confundida e utilizada como chá medicinal de forma incorreta, evidenciando a necessidade de pesquisas que promovam o conhecimento do seu potencial de genotoxicidade.

1.2 Teste *Allium cepa* L

O sistema teste *A. cepa* serve como uma forma para identificar possíveis efeitos tóxicos, pela avaliação de genotoxicidade, citotoxicidade, toxicidade e atividade antimutagênica, servindo como bioindicador. *A. cepa* tem sido indicada pela sua alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-testes, principalmente com os de mamíferos (TEIXEIRA *et al.*, 2003; BAGATINI *et al.*, 2007).

O teste foi introduzido primeiramente por Levan (1938) como uma forma de sistema-teste, sofrendo adaptações posteriores na sua metodologia. Essas adaptações possibilitaram uma maior abrangência de utilização deste teste através da avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água e a avaliação dos efeitos de misturas complexas (SAMPAIO, 2012).

Rank e Nielsen (1994) mostraram, além da maior sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação aos testes de Ames e Microscreen, uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores.

O teste é baseado na avaliação de efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos potenciais, medido pela gravação de anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas da ponta de raiz, sendo um excelente teste para estudar aberrações em anáfase (FATIMA; AHMAD, 2006).

Toxicidade refere-se à propriedade de uma substância que produz efeitos danosos aos organismos expostos durante um determinado tempo em concentração determinada e os efeitos adversos podem ser mortalidade, inibição da reprodução, bem como crescimento reduzido dos organismos teste (ABNT, 2004). De acordo com Pons & Pinto (2013), a citotoxicidade pode ser definida como a ação que um determinado composto exerce sobre as células, com possibilidade de levar a morte celular. Considerado um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular

induzida e está presente em todos os organismos multicelulares e unicelulares. Enquanto que os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por terem a capacidade de alterar a replicação do DNA e conseqüentemente a transmissão genética (TEDESCO & LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Nos bioensaios com *A. cepa*, após a exposição dos bulbos de cebola à solução teste por um determinado período, é possível avaliar tanto efeitos citotóxicos, através da redução do crescimento das raízes ou da diminuição do índice mitótico, como efeitos genotóxicos, geralmente através da análise de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÖ & LEVAN, 1994).

O método de avaliação, sistema *A. cepa*, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA *et al.*, 2004; FACHINETTO *et al.*, 2007). O sistema é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais, pois suas raízes ficam em contato direto com a substância testada, o que permite a avaliação de diferentes concentrações.

Vários autores, como, Vicentini *et al.* (2001), Camparoto *et al.* (2002), Teixeira *et al.* (2003), Knoll *et al.* (2006), Fachinetti *et al.* (2007), mostraram que os principais efeitos que ocorrem são mutagenicidade e anti-mutagenicidade, bem como aumento e diminuição da proliferação celular de pontas de raízes tratadas com diferentes espécies de plantas medicinais.

A eficiência do sistema *A. cepa* se deve as suas características cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e tamanho grande (FISKEJO, 1994; MITTEREGGER-JÚNIOR *et al.*, 2006; CARITÁ & MARIN-MORALES, 2008).

O índice mitótico (IM) é caracterizado pela razão entre número total de células em divisão no ciclo celular e o total de células analisadas, tem sido usado como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes.

1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A padronização química de plantas medicinais pode envolver técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permite análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas com alta resolução e sensibilidade (PAIVA *et al.*, 2002).

De acordo com Bevilaqua *et al.* (2001) a análise da composição química das plantas possui uma dupla importância. Torna-se essencial para efeitos de comercialização do material, identificando os materiais mais atrativos à indústria farmacêutica, além de auxiliar aos produtores na seleção de genótipos mais eficientes em termos fitoterápicos.

CLAE consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (SNYDER *et al.*, 1997).

Esta técnica tem sido usada de maneira rotineira para análise e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas, como extratos de plantas, obtendo-se cromatogramas que são usados como “impressão digital” ou *fingerprint*, fornecendo informações importantes quanto ao tipo de constituintes presentes (GOMES, 2009). A utilização de perfis cromatográficos ou *fingerprints* são para análises de extratos vegetais, pois possibilita obter representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise e, desta forma, permite estabelecer um parâmetro comparativo para reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise (ALAERTS *et al.*, 2007).

Jiang *et al.* (2009) utilizaram *fingerprint* para diferenciar quatro espécies de Cistanche (*C. deserticola*, *C. tubulosa*, *C. salsa* e *C. sinensis*), através da CLAE acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas. Os resultados comparativos demonstraram que o *fingerprint* de *C. tubulosa* e *C. salsa* possuem alta similaridade, enquanto que o da *C. sinensis* possui baixa similaridade.

Desta forma, a cromatografia *fingerprint* foi uma poderosa ferramenta para diferenciação destas espécies podendo ser utilizado para o controle de qualidade.

Estudo conduzido por Filip *et al.* (2001) avaliou a presença de compostos fenólicos e de flavonoides em macerados aquosos de *Ilex paraguariensis* St. Hill e outras sete espécies sul-americanas do gênero *Ilex* (*I. brevicuspis*; *I. theezans*; *I. microdonta*; *I. dumosa* var. *dumosa*; *I. taubertiana*; *I. pseudobuxus* e *I. argentina*), comumente utilizadas como adulterantes da erva-mate. Através das análises por CLAE-DAD, os autores encontraram maiores teores destes compostos em *I. paraguariensis*, quando comparados às outras sete espécies. Especificamente para *I. paraguariensis* foi detectado uma concentração de 9,6% de derivados fenólicos no extrato seco, com a presença de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico e de 0,06% dos flavonoides rutina, quercetina e kaempferol.

Deve-se considerar que um cromatograma fornece apenas uma peça de informação qualitativa acerca de cada espécie em uma amostra, a saber, seu tempo de retenção ou sua posição sobre a fase após certo período de eluição e não indica o número total dos compostos existentes na amostra (HENDRINKS *et al.*, 2005).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O material botânico constou de indivíduos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* coletados na regiões de Silveira Martins=SvM (Pop.1 de *S. montevidensis*), São Sepé=SS (Pop. 1 de *E. grandiflorus*), grupo 1 e Santa Maria=SM (Pop. 2 de *S. montevidensis*) e Pinhal Grande=PG (Pop. 2 de *E. grandiflorus*), grupo 2, no estado do Rio Grande do Sul, a partir de folhas de espécimes a campo e de *E. grandiflorus* comercializado em supermercado como chá medicinal, separados em 2 grupos experimentais. O material coletado foi devidamente identificado, segundo normas usuais em taxonomia (MORI *et al.*, 1989) e parte incorporada ao herbário SMDB do Departamento de Biologia da UFSM.

Os bulbos de cebola utilizados, como bioindicador de genotoxicidade, para o grupo experimental 1 foram adquiridos na feira de produtos naturais realizada próximo a UFSM e para o grupo experimental 2 foram adquiridos em supermercado da cidade de São Francisco de Assis.

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM.

2.2 Métodos

Foram utilizadas folhas para o preparo dos extratos, coletadas de plantas crescendo naturalmente na mata e comercializada em embalagem adquirida em supermercado.

2.2.1 Preparo dos extratos

Os extratos aquosos, a partir das folhas coletadas a campo previamente secas a temperatura ambiente e das folhas comercializadas, foram preparados em duas concentrações: a usual de 6g. L^{-1} e quatro vezes mais concentrado, 24g. L^{-1} . O preparo utilizado foi por infusão das folhas secas com água destilada após ebulição e deixadas por 15 minutos. Os extratos foram coados em peneira de 10 mesh e após atingirem temperatura ambiente, utilizados para o enraizamento dos bulbos de *A. cepa*.

2.2.2 Sistema teste vegetal "in vivo": Ação dos extratos sobre a divisão celular das radículas de cebola

As células meristemáticas das radículas de cebola foram utilizadas como sistema teste para avaliar as alterações morfológicas e estruturais celulares e para determinar os índices mitóticos.

Na primeira etapa, grupo experimental 1, foram colocados 8 grupos de 5 bulbos, para enraizar em água destilada, os quais constituíram 8 tratamentos com 5 repetições cada. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T1- Controle negativo em água destilada; T2- Extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão 6g.L^{-1} (SS) ; T3- Extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão 24g.L^{-1} (SS) ; T4- Glifosato 15% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão 24g.L^{-1} (SS) (verificação da atividade antimutagênica) T5- Extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* por infusão 6g.L^{-1} (SvM) ; T6- Extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* por infusão 24g.L^{-1} (SvM) ; T7- Glifosato 15% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* 24g.L^{-1} (SvM) (verificação da atividade antimutagênica); T8- Controle positivo em Glifosato 15%.

Na segunda etapa, grupo experimental 2, foram colocados 10 tratamentos com 5 repetições cada. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T9- Controle negativo em água destilada; T10- Extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão 6g.L^{-1} (PG) ; T11- Extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão

24g.L⁻¹ (PG) ; T12-Glifosato 15% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *E. grandiflorus* por infusão 24g.L⁻¹ (PG) (verificação da atividade antimutagênica) T13- Extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* por infusão 6g.L⁻¹ (SM); T14- Extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* por infusão 24g.L⁻¹ (SM); T15- Glifosato 15% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ (SM) (verificação da atividade antimutagênica); T16- Controle positivo em Glifosato 15%; T17- Extrato aquoso de *E. grandiflorus* “comercial” por infusão 6g.L⁻¹; T18-Extrato aquoso de *E. grandiflorus* “comercial” por infusão 24g.L⁻¹(figura 3).

Todos os grupos tratamento foram submetidos aos tratamentos por 24 horas. Após, os bulbos foram recolocados em água destilada para respectivas recuperações dos possíveis danos ocorridos, por um período de 24 horas. As radículas dos bulbos de cada tratamento foram coletadas e colocadas em fixador 3:1 (etanol : ácido acético) por um período de 24 horas em temperatura ambiente, após colocadas em álcool 70% e armazenadas em refrigerador até o preparo das lâminas.

O controle positivo utilizado foi o glifosato, pois comprovadamente induz alterações cromossômicas e inibe a divisão celular em células meristemáticas de *A. cepa* (Souza *et al.*, 2010).



Figura 3 – Bulbos de cebola em contato com as infusões das espécies estudadas: A- População 1, B- População 2.

Para observação de possível atividade antimutagênica foram utilizados os bulbos que depois de submetidos ao glifosato 15% (mutações induzidas do tipo cromossômica estrutural) por 24 horas, foram posteriormente colocados nos extratos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* (separadamente) por 24 horas para observação da minimização de danos aos cromossomos de *A. cepa*.

Em uma terceira etapa, foi realizada a análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola cultivadas nos extratos de plantas e nos controles (água e glifosato 15%). Radículas, foram coletadas com aproximadamente 5 mm, hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, após lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% e preparadas às lâminas pelo método de esmagamento (adaptada de GUERRA & SOUZA, 2002). A região meristemática foi esmagada com auxílio de um pequeno bastão de vidro e sobre o material colocado à lamínula. Foram preparadas 2 lâminas por bulbos de cebola. As lâminas foram observadas ao microscópio LEICA 400X, e analisadas. Foi realizada a contagem total de células em divisão e calculado o índice mitótico (IM) baseando-se na porcentagem de células em divisão. Foram contadas 1000 células por bulbo, totalizando 5000 células por grupo de bulbos para cada um dos tratamentos e para cada uma das espécies em estudo.

Após a análise, algumas lâminas foram seladas, com cola cimento vulcanizada e armazenadas em geladeira por um dia e então realizou-se a montagem de lâminas permanentes com o uso de meio de inclusão rápida, como o Entellan (GUERRA & SOUZA, 2002).

2.2.3 Análise dos chás por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Em uma quarta etapa, amostra dos chás feitos por infusão das folhas das espécies estudadas, *E. grandiflorus*, *E. grandiflorus* “comercial” e *S. montevidensis*, de ambos os grupos, foram levadas ao Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, onde foram realizadas as análises por CLAE-DAD.

Os componentes na mistura complexa (chá), obtido a partir de folhas de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*, foram determinados pelo método de separação de substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Onde foram obtidos os compostos fenólicos e compostos flavonóides dos extratos aquosos de cada espécie, sendo as concentrações de 24g.L⁻¹ para o grupo experimental 1 e 6g.L⁻¹ e 24g.L⁻¹ para o grupo experimental 2.

2.2.3.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais

Todos os produtos químicos foram de grau analítico. Sendo, Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A quercetina e rutina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com o sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), Auto Sampler Prominence (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT bombas alternativas ligadas ao desgaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, UV-VIS DAD detector por arranjo de diodos SPD-M20A e software LC solution SP1 1,22.

2.2.3.2 Quantificação dos compostos por meio de CLAE-DAD

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente utilizando coluna C₁₈ (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5µm de diâmetro. A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), onde o gradiente de composição foi: 5% de B até 2 min e alterado para se obter 25%, 40%, 50%, 60% e 100% de B em 10, 20, 30, 40, 50 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Sabir *et al.* (2012) com ligeiras modificações. As infusões das folhas de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* foram analisados a uma concentração de 24 g.L⁻¹ do grupo 1 e de 6 e 24 g.L⁻¹ do grupo 2. Investigaram a presença de cinco compostos de anti-oxidantes, sendo eles, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e rutina.

A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção no UV com os dos padrões comerciais.

A taxa de fluxo foi de 0,7 mL.min⁻¹, volume de injeção de 50 µL e o comprimento de onda de 254 nm para ácido gálico, 325 nm para ácidos cafeico e clorogênico, e 365 nm para a quercetina e rutina. As amostras e fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultrassons antes da utilização. As soluções de

referência de normalização foram preparadas em fase móvel para CLAE em uma gama de concentrações de 0,020-0,200 mg.ml⁻¹ para a quercetina e rutina e 0,050-0,250 mg.ml⁻¹ para ácido gálico, ácidos cafeico e clorogênico.

Os picos de cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 11503x + 1376,8$ ($r = 0,9998$), ácido clorogênico: $Y = 10955x + 1274,3$ ($r = 0,9995$), ácido cafeico: $Y = 12764x + 1350,7$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 13721 + 1168,4$ ($r = 0,9997$) e quercetina: $Y = 13495x + 1092,6$ ($r = 0,9999$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

2.2.4 Análise Estatística

Foi utilizada a análise estatística para a comparação entre os valores dos índices mitóticos e entre os valores das alterações cromossômicas, pelo teste Qui-quadrado (χ^2), com o auxílio do programa BIOESTAT 5.0 (AYRES, 2007). E para os resultados do CLAE pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

3.1.1 Sistema teste *Allium cepa*

A tabela 1 mostra o número total de células analisadas, o número observado de células em interfase e nos diferentes estágios de divisão celular, bem como os valores dos índices mitóticos (IM).

Para o grupo experimental 1, os valores referentes ao índice mitótico das células foram de 7,6% para o controle negativo (água); 11,14% para o T2 (6g.L⁻¹ de *E. grandiflorus*); 0,86% para T3 (24g.L⁻¹ de *E. grandiflorus*); 1,08% para T4 (antimutagênico de *E. grandiflorus*); 9,64% para T5 (6g.L⁻¹ de *S. montevicensis*); 9,84% para T6 (24g.L⁻¹ de *S. montevicensis*); 0,82% para T7 (antimutagênico de *S. montevicensis*) e 1,02% para o controle positivo (glifosato 15%).

Os resultados diferiram significativamente entre os controles e os tratamentos ($\chi^2 = 398.973$), ao se comparar os IM do controle negativo (água) (IM=7,6%) com o controle positivo (glifosato 15%) (IM= 1,02%). Houve diferença significativa entre os controles (T1xT8, $\chi^2 = 3342.365$), o que mostra inibição da divisão celular.

O controle negativo diferiu significativamente entre todos os tratamentos, onde os valores para χ^2 foram: T1xT2= 47.639, T1xT3= 257.781, T1xT4 = 233.949, T1xT5= 19.983, T1xT6 = 23.08, T1xT7= 262.319 e T1xT8 = 3342.365.

Para a espécie *E. grandiflorus*, houve um aumento significativo da divisão celular na concentração de 6g.L⁻¹ (T2) em relação ao tratamento na concentração de 24g.L⁻¹ (T3), onde, $\chi^2 = 468.433$ e em relação aos controles negativo e positivo ($\chi^2 = 47.639$ e $\chi^2 = 5309.225$, respectivamente). Relacionando o T2 com o T4 (avaliação antimutagênica) houve diferença significativa ($\chi^2 = 441.037$) e T4 também diferiu significativamente do controle positivo ($\chi^2 = 258.969$).

O extrato de *E. grandiflorus* na concentração de 24g.L⁻¹ apresentou uma inibição da divisão celular (IM= 0,86%), apresentando uma diferença significativa com o controle negativo ($\chi^2=257.781$) e com o controle positivo ($\chi^2=172.788$).

Os extratos de *S. montevidensis*, 6g.L⁻¹ (T5) e 24g.L⁻¹ (T6), apresentaram IM semelhantes (IM=9,64% e IM=9,84%, respectivamente) não diferindo significativamente entre si ($\chi^2= 0.114$). Porém, ambas as concentrações, diferiram significativamente em relação aos controles, onde os χ^2 foram de: T1xT5=19.983, T1xT6 = 23.08, T5xT8= 4582.280 e T6xT8= 4680.226. Relacionando T5 e T6 com T7 (avaliação antimutagênica), houve uma inibição da divisão celular de T7 (IM= 0,82%), diferindo significativamente, T5xT7 ($\chi^2= 392.378$) e T6xT7 ($\chi^2= 403.101$). E T7 diferiu significativamente do controle positivo (T8) ($\chi^2= 158.158$).

Avaliando a atividade antimutagênica de ambas as espécies, T4 e T7, apresentou um pequeno aumento na divisão celular do tratamento antimutagênico com *E. grandiflorus* 24g.L⁻¹ (IM= 1,08%), diferindo significativamente do tratamento antimutagênico com *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ ($\chi^2= 1.796$).

Ao comparar a atividade antimutagênica (T4 e T7) das espécies estudadas com as diferentes concentrações dos extratos (T2, T3, T5 e T6), ambas, apresentaram redução no IM, o que conferiu diferença significativa entre, T2xT7 ($\chi^2= 473.563$), T3xT4 ($\chi^2= 1.260$), T4xT5 ($\chi^2= 361.117$), T4xT6 ($\chi^2= 371.655$). Somente a relação entre *E. grandiflorus* 24g.L⁻¹ (T3) e a atividade antimutagênica de *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ (T7) não diferiram significativamente ($\chi^2= 0.048$).

Fazendo um comparativo entre as espécies, os tratamentos apresentaram diferença significativa, T2xT5 ($\chi^2= 6.042$), T2xT6 ($\chi^2= 4.500$), T3xT5 ($\chi^2=387.428$), T3xT6 ($\chi^2=398.124$).

Para o grupo experimental 2, os valores de IM foram de 3,38% para o controle negativo (T9=água); 4,82% para T10 (6g.L⁻¹ de *E. grandiflorus*); 1,88% para T11 (24g.L⁻¹ de *E. grandiflorus*); 0,4% para T12 (antimutagênico de *E. grandiflorus*); 5,04% para T13 (6g.L⁻¹ de *S. montevidensis*); 1,84% para T14 (24g.L⁻¹ de *S. montevidensis*); 0,26% para T15 (antimutagênico de *S. montevidensis*); 0,16% para o controle positivo (T16=glifosato 15%); 4,32% para T17 (6g.L⁻¹ de *E. grandiflorus* “comercial”) e 4,76% para T18 (24g.L⁻¹ de *E. grandiflorus* “comercial”).

As análises diferiram significativamente entre os controles e os tratamentos ($\chi^2= 107.904$). Ao se comparar os IM do controle negativo (IM=3,38%) com o do

controle positivo (IM=0,16%) houve diferença significativa entre os controles (T9xT16, $\chi^2= 1812.843$).

O controle negativo (T9) diferiu significativamente entre todos os tratamentos, onde os valores de χ^2 foram de: T9xT10=13.184; T9xT11=21.966; T9xT12=119.728; T9xT13=17.083; T9xT14=23.325; T9xT15=136.193; T9xT17=5.967; T9xT18=12.194.

Para a espécie *E. grandiflorus* houve uma diminuição do IM entre as concentrações de 6g.L⁻¹ (T10) e de 24g.L⁻¹ (T11) diferindo significativamente entre elas ($\chi^2= 66.740$). Ao relacionar a espécie coletada a campo com a comercializada, somente o T10 e T18 (comercial 24g.L⁻¹) não apresentaram diferença significativa ($\chi^2= 0.020$). Os demais tratamentos diferiram significativamente entre si, onde χ^2 :

T10xT17=1.433; T11xT17=49.549; T11xT18=64.603 e T17xT18=1.117.

Relacionando o T10, T11, T17 e T18 com o T12 (atividade antimutagênica) houve diferença significativa entre eles (T10xT12, $\chi^2= 192.145$; T11xT12, $\chi^2= 48.589$; T12xT17, $\chi^2= 166.714$ e T12xT18, $\chi^2= 189.080$).

O extrato aquoso de *S. montevicensis* 24g.L⁻¹ (T14) apresentou aumento da inibição celular comparado com o extrato de 6g.L⁻¹ (T13), diferindo significativamente entre eles ($\chi^2= 77.070$). A atividade antimutagênica de *S. montevicensis* (T15) diferiu significativamente de T13 ($\chi^2= 221.419$) e T14 ($\chi^2= 60.069$). E ambas as atividades antimutagênicas (T12 e T15) apresentaram diferenças significativa entre si ($\chi^2= 1.490$).

Ao comparar as atividades antimutagênicas (T12 e T15) com os demais tratamentos (T10, T11, T13, T14, T17 e T18), apresentaram redução no IM, o que conferiu uma diferença significativa entre, T10xT15 ($\chi^2= 209.995$), T11xT15($\chi^2= 61.981$), T12xT13($\chi^2= 203.415$), T12xT14($\chi^2= 46.810$), T14xT15($\chi^2= 60.069$), T15xT17($\chi^2= 184.169$) e T15xT18 ($\chi^2= 206.886$).

O controle positivo, glifosato 15% (T16), diferiu significativamente de todos os tratamentos, T10xT16 ($\chi^2= 2597.945$), T11xT16 ($\chi^2= 973.969$), T12xT16 ($\chi^2= 144.636$), T13xT16 ($\chi^2= 2716.076$), T14xT16 ($\chi^2= 951.349$), T15xT16 ($\chi^2= 74.868$), T16xT17 ($\chi^2= 2327.677$) e T16xT18 ($\chi^2= 2565.645$).

Fazendo um comparativo entre as espécies, os tratamentos *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ (T10) e *S. montevicensis* 6g.L⁻¹ (T13) ($\chi^2= 0.258$), *E. grandiflorus* 24g.L⁻¹ (T11) e *S. montevicensis* 24g.L⁻¹ (T14) ($\chi^2= 0.022$), *S. montevicensis* 6g.L⁻¹ (T3) e *E. grandiflorus* “comercial” 24g.L⁻¹ (T18) ($\chi^2=0.421$), não diferiram significativamente.

Enquanto que, T10xT14 ($\chi^2= 68.966$), T11xT13 ($\chi^2= 74.736$), T13xT17 ($\chi^2= 2.905$), T14xT17 ($\chi^2= 51.509$) e T14xT18 ($\chi^2= 66.798$), apresentaram diferença significativa.

A tabela 2 mostra o total de células em divisão, número e tipos de aberrações celulares e o total de células irregulares encontradas.

O efeito genotóxico foi avaliado pela quantificação e diferenciação das células normais (Figura 4 A) de aberrações cromossômicas, tais como, pontes anafásicas e telofásicas (Figura 4 B; C; D), células binucleadas (Figura 4 E), cromossomos perdidos (Figura 4 L), quebras (Figura 4 H) e células desorganizadas (Figura 4 F, G e M).

Foram encontradas um total de quatro células binucleadas em interfase, sendo, uma no T5, duas no T6 e uma no T18 e três células com micronúcleos (Figura 4 J), sendo uma no T5, uma no T6 e uma no T17.

Ao analisar os resultados obtidos do grupo 1 , houve uma diferença significativa na comparação dos valores das alterações cromossômicas entre o controle negativo, sem alterações, e o controle positivo com 5 alterações ($\chi^2 =222.635$).

Os extratos aquosos de *E. grandiflorus*, em ambas as concentrações, tiveram seus números de alterações comparados com os do controle negativo e o resultado para o concentração de 6g.L^{-1} (160 alterações) foi $\chi^2 =191.844$ e para a concentração de 24g.L^{-1} (22 alterações) foi $\chi^2 = 259.301$. Houve diferença estatística nos 2 tratamentos, até mesmo comparando os tratamentos entre si ($\chi^2 = 511.421$), indicando um maior potencial genotóxico para a menor concentração.

Em comparação com o controle positivo, os extratos de *E. grandiflorus* em menor ($\chi^2 = 539.128$) e maior concentração ($\chi^2 = 17.859$), diferiu significativamente. O tratamento com os extratos em ambas as concentrações (T2 e T3) de *E. grandiflorus* diferiu dos tratamentos T4 (T2xT4: $\chi^2 =494.882$; T3xT4: $\chi^2 =1.687$), T5 (T2xT5: $\chi^2 =25.052$; T3xT5: $\chi^2 =385.833$), T6 (T2xT6: $\chi^2 =11.741$; T3xT6: $\chi^2 =413.759$), T7 (T2xT7: $\chi^2 =564.997$; T3xT7: $\chi^2 =20.000$).

As concentrações dos extratos da espécie *S. montevidensis* diferiram do controle negativo ($\chi^2 = 101.268$ para o extrato em 6g.L^{-1} com 100 alterações e $\chi^2 =126.712$ para a concentração de 24g.L^{-1} com 125 alterações). Em comparação com o controle positivo, os resultados foram $\chi^2 = 408.367$ para a menor concentração e $\chi^2 = 438.876$ para a concentração mais elevada, diferindo significativamente. T5xT6 (χ^2

=2.908), diferiram entre si, indicando potencial genotóxico para a maior concentração.

O tratamento com os extratos de ambas as concentrações (T5 e T6) de *S. montevidensis* diferiam dos tratamentos T4 (T4xT5=368.108; T4xT6=396.798) e T7 (T5xT7=433.655; T6xT7=464.236).

O presente estudo também avaliou o efeito antimutagênico dos extratos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*. Para esta avaliação, as alterações cromossômicas observadas no controle positivo (glifosato 15%) e no controle negativo (água) foram analisadas, comparadas com os valores das alterações observadas nos tratamentos T4 e T7, em que os bulbos de cebola foram tratados primeiramente, por 24 horas em glifosato 15% e posteriormente tratados com *E. grandiflorus* 24g.L⁻¹ (T4) e *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ (T7). O tratamento T4 apresentou 20 alterações e T7 apresentou 6 alterações, diferindo significativamente do controle negativo (T1), onde χ^2 : T1xT4=232.534 e T1xT7=248.774.

Os tratamentos também diferiram do controle positivo, T4xT8=13.289; T7xT8=2.075 e entre eles T4xT7=17.696.

Analisando os resultados obtidos do grupo 2, houve uma diferença significativa na comparação dos valores das alterações cromossômicas entre o controle negativo (água) com 3 alterações cromossômicas e o controle positivo (glifosato 15%) com 0 alterações ($\chi^2 = 146.842$). O controle positivo desta população não apresentou alterações, devido ao número muito pequeno de células em divisão celular (8/5000), enquanto que o controle negativo apresentou 3, o que pode ser resultado de alteração natural, pois apresentou 169/5000.

Os extratos aquosos de *E. grandiflorus*, em ambas as concentrações, tiveram seus números de alterações comparados com os do controle negativo e o resultado para a concentração de 6g.L⁻¹ (21 alterações) foi $\chi^2 = 25.369$ e para a concentração de 24g.L⁻¹ (0 alterações) foi $\chi^2 = 23.797$, e houve diferença significativa nos dois tratamentos, mesmo quando comparando os tratamentos entre si ($\chi^2 = 82.801$), indicando um maior potencial genotóxico para a menor concentração.

Em comparação ao controle positivo (glifosato 15%), os extratos de *E. grandiflorus* em menor concentração ($\chi^2 = 232.889$) diferiu significativamente e a maior concentração não diferiu do controle positivo ($\chi^2 = 0$).

Os tratamentos com os extratos em ambas as concentrações (T10 e T11) de *E. grandiflorus* diferiram dos tratamentos T12 (T10xT12: $\chi^2 = 191.618$; T11xT12: $\chi^2 = 52.567$), T13 (T10xT13: $\chi^2 = 2.700$; T11xT13: $\chi^2 = 81.382$), T14 (T10xT14: $\chi^2 = 67.371$; T11xT14: $\chi^2 = 11.014$), T15 (T10xT15: $\chi^2 = 219.756$); 17 (T10xT17: $\chi^2 = 1.408$; T11xT17: $\chi^2 = 68.992$); 18 (T10xT18: $\chi^2 = 0.768$; T11xT18: $\chi^2 = 86.659$). Os tratamentos T11 e T15 não diferiram entre si ($\chi^2 = 0$).

As concentrações dos extratos da espécie *S. montevidensis* diferiram do controle negativo ($\chi^2 = 20.954$ para o extrato em $6g.L^{-1}$ com 12 alterações e $\chi^2 = 26.826$ para a concentração de $24g.L^{-1}$ com 11 alterações), e em comparação com o controle positivo, os resultados foram $\chi^2 = 234.750$ para a menor concentração e $\chi^2 = 80.675$ para a concentração mais elevada, diferindo significativamente. Os tratamentos T13 e T14 ($\chi^2 = 71.979$) diferiram entre si.

Os tratamentos com os extratos de ambas as concentrações (T13 e T14) de *S. montevidensis* diferiam dos tratamentos T12 (T12xT13: $\chi^2 = 195.318$; T12xT14: $\chi^2 = 47.938$), T15 (T13xT15: $\chi^2 = 221.553$; T14xT15: $\chi^2 = 69.643$), 17 (T13xT17: $\chi^2 = 6.167$; T14xT17: $\chi^2 = 52.378$) e T18 (T13xT18: $\chi^2 = 6.169$, T14xT18: $\chi^2 = 68.816$).

O estudo avaliou o efeito antimutagênico dos extratos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* do grupo 2. Para esta avaliação, as alterações cromossômicas observadas no controle positivo (glifosato 15%) e no controle negativo (água) foram analisados, e os valores comparados com os valores das alterações observadas nos tratamentos T12 e T15, nos quais os bulbos de cebola foram tratados, primeiramente, por 24 horas em glifosato 15% e posteriormente tratados com *E. grandiflorus* $24g.L^{-1}$ (T12) e *S. montevidensis* $24g.L^{-1}$ (T15). O tratamento T12 apresentou cinco alterações e T15 apresentou zero alterações, diferindo significativamente do controle negativo (T1), onde χ^2 : T9xT12=115.871; T9xT15=134.265.

O tratamento T12 também diferiu do controle positivo, T12xT16: $\chi^2 = 10.114$ e do T5 ($\chi^2 = 6.471$), enquanto que T15 não diferiu do controle positivo ($\chi^2 = 0$).

A comparação dos extratos de *E. grandiflorus* "comercial", na concentração $6g.L^{-1}$ (23 alterações) diferiu estatisticamente da concentração $24g.L^{-1}$ (27 alterações) ($\chi^2 = 1.322$). Os extratos "comercial" diferiram dos seguintes tratamentos,

T12 (T12xT17: $\chi^2=169.963$; T12xT18: $\chi^2=193.834$) e T15 (T15xT17 : $\chi^2=198.066$; T15xT18: $\chi^2=222.648$).

E. grandiflorus “comercial”, em ambas as concentrações (T17 e T18) , também diferiram dos controles (negativo-T9xT17: $\chi^2=20.692$; T9xT18: $\chi^2=30.071$ e positivo-T16xT17: $\chi^2=211.043$; T16xT18: $\chi^2=235.759$).

Tabela 1 – Número de células em interfase, número de células em divisão e índice mitótico.

Tratamentos	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
Grupo experimental 1				
T1-Controle negativo (água)	5000	4642	358	7,16 d
T2- <i>E. grandiflorus</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4443	557	11,14 a
T3- <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4957	43	0,86 g h
T4- glifosato+ <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4946	54	1,08 e
T5- <i>S.montevideensis</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4518	482	9,64 c
T6- <i>S.montevideensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4508	492	9,84 b c
T7- glifosato + <i>S.montevideensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	5000	4959	41	0,82 h
T8-Controle positivo (glifosato)	5000	4949	51	1,02 f
Grupo experimental 2				
T9-Controle negativo (água)	5000	4831	169	3,38 e
T10- <i>E. grandiflorus</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4759	241	4,82 b c
T11- <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4906	94	1,88 f g
T12- glifosato + <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4980	20	0,4 h
T13- <i>S.montevideensis</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4748	252	5,04 a c
T14- <i>S.montevideensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4908	92	1,84 g
T15-glifosato + <i>S.montevideensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	5000	4987	13	0,26 i
T16- Controle positivo (glifosato)	5000	4992	8	0,16 j
T17- <i>E.grandiflorus</i> comercial 6g.L ⁻¹	5000	4784	216	4,32 d
T18- <i>E. grandiflorus</i> comercial 24g.L ⁻¹	5000	4762	238	4,76 c

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de χ^2 a nível de 5%.

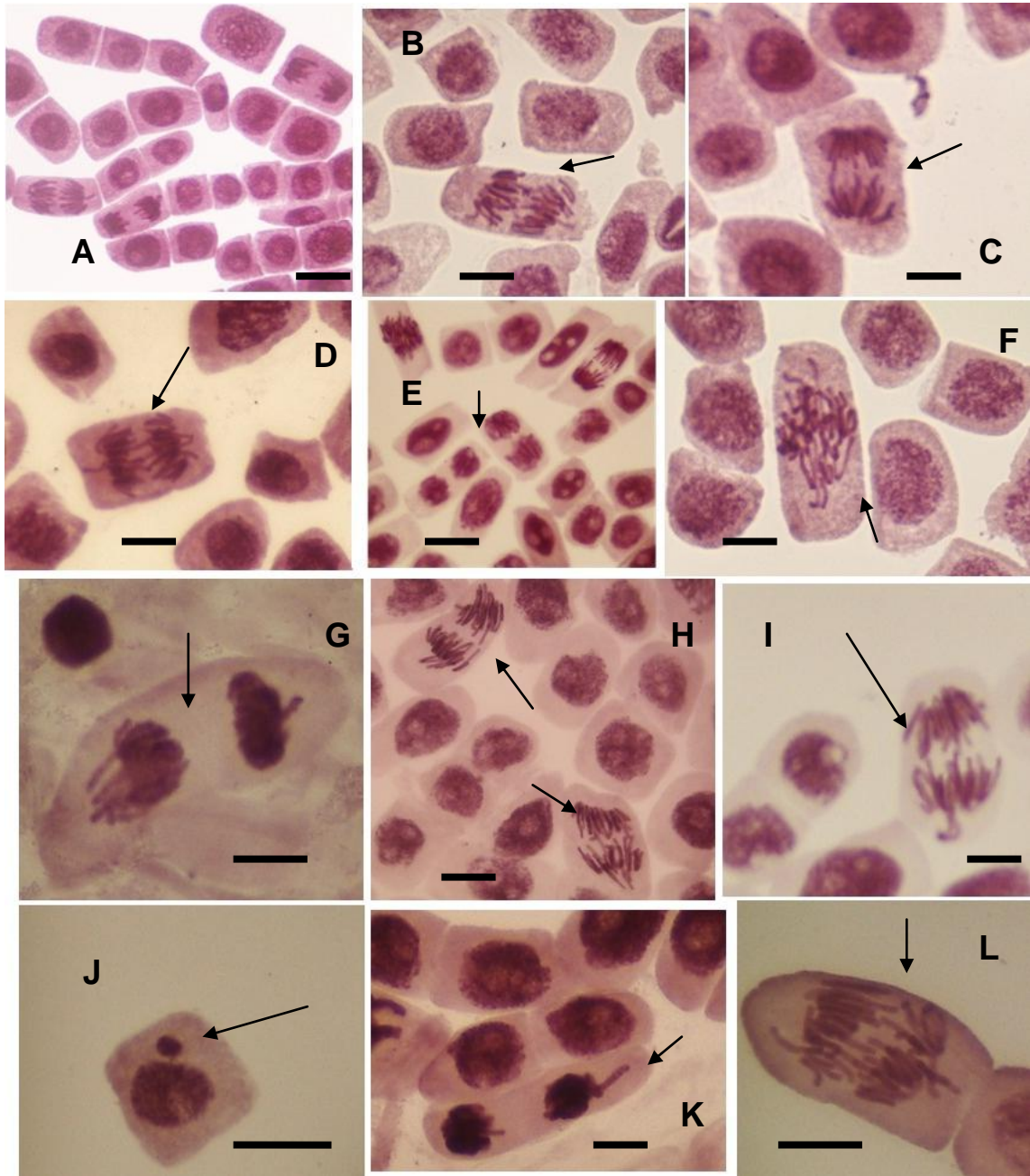


Figura 4 – Células de *Allium cepa* em diferentes fases da divisão celular:

A- Células normais do tratamento com *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ (Pop. 1); B- Célula com ponte anafásica e quebra do tratamento com *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ (Pop. 1); C- Célula com ponte anafásica do tratamento com *E. grandiflorus* 24g.L⁻¹ (Pop. 1); D- Célula com ponte anafásica do tratamento com *S. montevidensis* 6g.L⁻¹ (Pop. 1); E- Célula binucleada em interfase do tratamento com *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ (Pop. 1); F- Célula com prófase desorganizada do tratamento *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ (Pop. 1); G- Célula em telófase com desorganização do tratamento *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ (Pop. 2); H- Células em anáfase com quebras cromossômicas do tratamento *S. montevidensis* 24g. L⁻¹ (Pop. 2); I- Célula em anáfase com ponte e cromossomo perdido do tratamento *S. montevidensis* 24g.L⁻¹ (Pop. 2); J- Célula com micronúcleo do tratamento *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ “comercial” (Pop. 2); K- Célula em telófase com cromossomo perdido do tratamento *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹ “comercial” (Pop. 2); L- Célula em anáfase desorganizada e com quebra cromossômica do tratamento *E. grandiflorus* “comercial” 24g.L⁻¹ (Pop. 2). 10 µm.

Tabela 2 – Número de células em divisão, número e tipos de aberrações celulares e número total de células irregulares

Tratamento	Aberrações celulares						Porcentagem de células irregulares (%)
	Células em divisão	Pontes	Quebras e cromossomos perdidos	MN [#]	Células desorganizadas	Total de células irregulares	
Grupo experimental 1							
T1-Controle negativo (água)	358	-	-	-	-	0 h	0,00
T2- <i>E. grandiflorus</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.1)	557	7	11	-	142	160 a	28,72
T3- <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	43	-	2	-	20	22 d	51,16
T4- glifosato + <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	54	-	2	-	16	20 e	37,03
T5- <i>S. montevidensis</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.1)	482	4	8	1	87	100 c	20,74
T6- <i>S. montevidensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	492	3	10	1	111	125 b	25,40
T7-glifosato + <i>S. montevidensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.1)	41	4	2	-	-	6 f	14,63
T8-Controle positivo (glifosato)	51	4	-	-	1	5 g	9,80
Grupo experimental 2							
T9-Controle negativo (água)	169	1	2	-	-	3 g	1,77
T10- <i>E. grandiflorus</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.2)	241	5	8	-	10	21c	8,71
T11- <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	94	-	-	-	-	0 h	0,00
T12- glifosato+ <i>E. grandiflorus</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	20	1	1	-	4	5 f	25,00
T13- <i>S. montevidensis</i> 6g.L ⁻¹ (Pop.2)	252	5	9	-	-	12 d	4,76
T14- <i>S. montevidensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	92	6	6	-	2	11 e	11,95
T15-glifosato + <i>S. montevidensis</i> 24g.L ⁻¹ (Pop.2)	13	0	-	-	-	0 h	0,00
T16-Controle positivo (glifosato)	8	-	-	-	-	0 h	0,00
T17- <i>E. grandiflorus</i> comercial 6g.L ⁻¹	216	10	9	1	6	23 b	10,64
T18- <i>E. grandiflorus</i> comercial 24g.L ⁻¹	238	12	4	-	11	27 a	11,34

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de χ^2 a nível de 5%. #Micronúcleos

3.1.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os resultados para a análise por CLAE das infusões das folhas de *Echinodorus grandiflorus* e *Sagittaria montevidensis*, do grupo 1, revelou a presença do ácido gálico ($t_R = 8,35$ min; pico 1), ácido clorogênico ($t_R = 18,14$ min; pico 2), ácido cafeico ($t_R = 21,09$ min; pico 3), glicosídeo fenol não identificado ($t_R = 26,91$ min; pico 4), rutina ($t_R = 31,56$ min; pico 5), flavonóides glicosídeos não identificados ($t_R = 34,26$ e $37,07$ min; picos 6 e 7, respectivamente) e quercetina ($t_R = 39,85$ min; pico 8) (Figura 5 e Tabela 3).

Para o grupo 2, a análise revelou a presença do ácido gálico ($t_R = 8,56$ min; pico 1), ácido clorogênico ($t_R = 18,13$ min; pico 2), ácido cafeico ($t_R = 21,74$ min, pico 3), glicosídeo fenol não identificado ($t_R = 27,91$ min; pico 4), rutina ($t_R = 31,68$ min; pico 5), flavonóides glicosídeos não identificados ($t_R = 34,27$ min; pico 6) e quercetina ($t_R = 39,92$ min; pico 7) (Figura 6 e Tabelas 4, 5 e 6). A análise CLAE revelou que os flavonóides e ácidos fenólicos estão presentes nos extratos de *Echinodorus grandiflorus* e *Sagittaria montevidensis*.

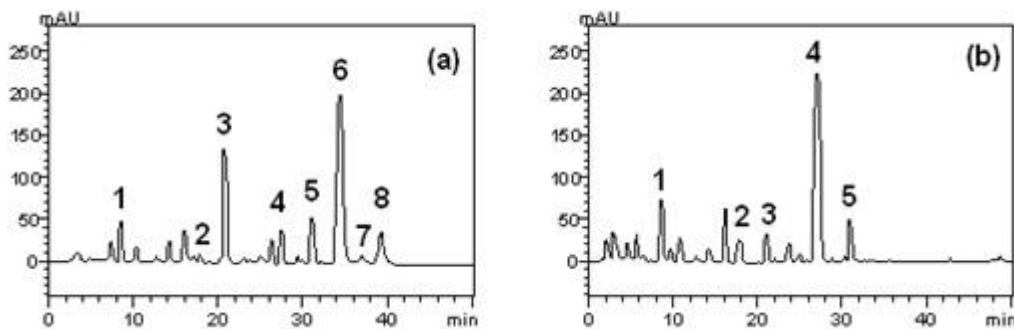


Figura 5 – Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (a) e *Sagittaria montevidensis* (b), detecção UV a 325 nm, grupo 1. De ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), glicosídeo fenol não identificado (pico 4), rutina (pico 5), flavonóides glicosídeo não identificado (pico 6 e 7) e quercetina (pico 8). Condições cromatográficas são descritos na seção de Métodos.

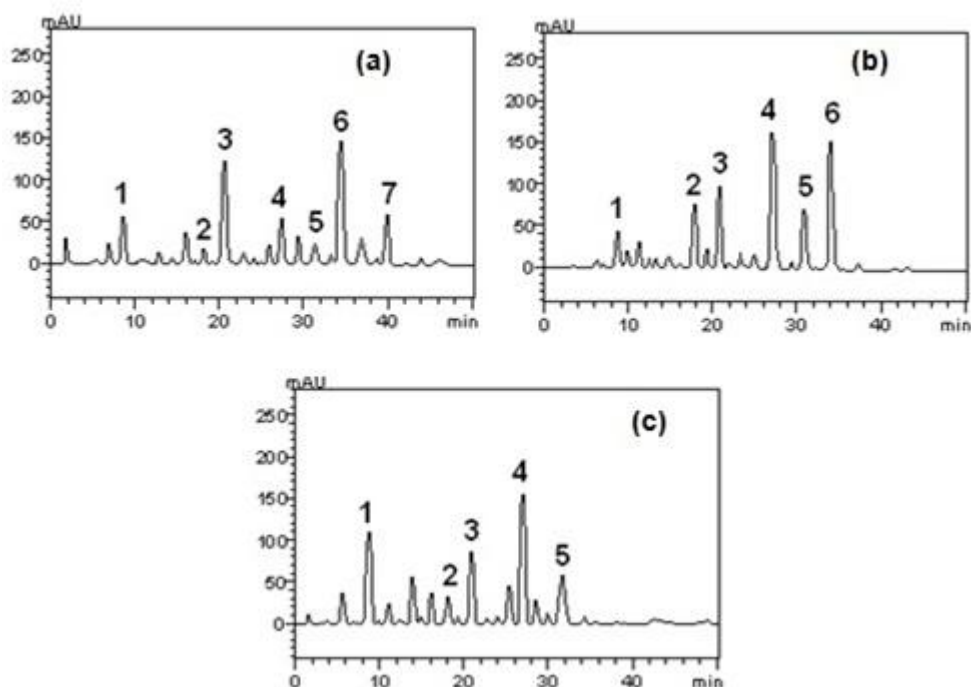


Figura 6 – Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (a), *E. grandiflorus* "comercial" (b) e *Sagittaria montevidensis* (c), detecção UV foi a 325nm, grupo 2. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), glicosídeo fenol não identificado (pico 4), rutina (pico 5), flavonóides glicosídeo não identificado (pico 6) e quercetina (pico 7). Condições cromatográficas são descritos na seção de Métodos.

Tabela 3 – Compostos fenólicos e flavonóides de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*, grupo1.

Compostos	<i>E. grandiflorus</i>		<i>S. montevidensis</i>	
	24g.L ⁻¹		24g.L ⁻¹	
	mg.g ⁻¹	%	mg.g ⁻¹	%
Ácido gálico	29,81 ± 0,02 a	2,98	41,57 ± 0,03 a	4,15
Ácido clorogênico	3,34 ± 0,03 b	0,33	26,87 ± 0,02 b	2,68
Ácido cafeico	84,77 ± 0,11 c	8,47	25,93 ± 0,01 b	2,59
Glicosídeo fenol *	28,53 ± 0,07 a	2,85	140,75 ± 0,05 c	14,07
Rutina	31,93 ± 0,04 a	3,19	28,06 ± 0,04 b	2,85
Flavonóides glicosídeo #	120,45 ± 0,09 d	12,04	-	-
Quercetina	22,70 ± 0,01 e	2,27	-	-

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$. * Quantificado como ácido cafeico, # quantificado como quercetina.

Tabela 4 – Compostos fenólicos e flavonóides de *E. grandiflorus* e *E. grandiflorus* “comercial”, grupo 2.

Compostos	<i>E. grandiflorus</i>		<i>E. grandiflorus</i> (Comercial)	
	mg.g ⁻¹		mg.g ⁻¹	
	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹
Ácido gálico	32,59 ± 0,02 a	8,37 ± 0,02 a	15,73 ± 0,03 a	3,91 ± 0,02 a
Ácido clorogênico	7,11 ± 0,02 b	1,95 ± 0,01 b	37,24 ± 0,01 b	9,32 ± 0,04 b
Ácido cafeico	80,15 ± 0,03 c	21,23 ± 0,01 c	45,73 ± 0,04 c	11,25 ± 0,01 c
Glicosídeo fenol*	29,93 ± 0,01 a	7,56 ± 0,03 a	91,64 ± 0,02 d	22,78 ± 0,03 d
Rutina	17,42 ± 0,01 d	4,27 ± 0,02 d	36,05 ± 0,03 b	9,01 ± 0,03 b
Flavonóide glicosídeo#	93,81 ± 0,04 e	23,35 ± 0,01 e	87,43 ± 0,01 e	21,95 ± 0,01 e
Quercetina	32,06 ± 0,03 a	8,01 ± 0,02 a	-	-

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$. * Quantificado como ácido cafeico, # quantificado como quercetina

Tabela 5 – Compostos fenólicos e flavonóides de *S. montevidensis*, grupo 2.

Compostos	<i>S. montevidensis</i>	
	mg.g ⁻¹	
	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹
Ácido gálico	45,67 ± 0,01 a	11,23 ± 0,04 a
Ácido clorogênico	15,05 ± 0,03 b	3,54 ± 0,03 b
Ácido cafeico	82,23 ± 0,01 c	21,05 ± 0,04 c
Glicosídeo fenol*	94,05 ± 0,03 d	23,61 ± 0,01 d
Rutina	30,94 ± 0,03 e	7,73 ± 0,02 e
Flavonóide glicosídeo [#]	96,17 ± 0,01 d	24,05 ± 0,01 d
Quercetina	2,33 ± 0,04 f	0,58 ± 0,02 f

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$. * Quantificado como ácido cafeico, # quantificado como quercetina

Tabela 6 – Porcentagem dos compostos fenólicos e flavonóides de *E. grandiflorus*, *E. grandiflorus* “comercial” e *S. montevidensis*, grupo 2.

Compostos	<i>E. grandiflorus</i>		<i>E. grandiflorus</i> “comercial”		<i>S. montevidensis</i>	
	%		%		%	
	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹
Ácido gálico	3,25	0,83	1,57	0,39	4,56	1,12
Ácido clorogênico	0,71	0,19	3,72	0,93	1,50	0,35
Ácido cafeico	8,01	2,13	4,57	1,12	8,22	2,10
Glicosídeo fenol*	2,99	0,75	9,16	2,27	9,40	2,36
Rutina	1,74	0,42	3,60	0,90	3,09	0,77
Flavonóide glicosídeo [#]	9,38	2,33	8,74	2,19	9,61	2,40
Quercetina	3,20	0,80	-	-	-	-

* Quantificado como ácido cafeico, [#] quantificado como quercetina.

3.2 Discussão

3.2.1 Sistema-teste *Allium cepa*

Neste estudo, o glifosato 15% inibiu a divisão celular, quando comparado com o controle negativo, indicando que a concentração de 15% é antiproliferativa. O glifosato pode ser usado como controle positivo, pois tem mostrado que induz alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* (Souza *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que houve estímulo à divisão celular das células submetidas aos extratos de *E. grandiflorus* 6g.L⁻¹, o que levou ao aumento do índice mitótico. Entretanto, na concentração 24g.L⁻¹, exceto do extrato “comercial”, quando comparados aos controles e aos extratos de menor concentração inibiram a divisão celular, causando uma redução no IM, podendo conferir potencial antiproliferativo, quando utilizado em elevadas concentrações.

Estudos realizados com outras espécies, testando diferentes concentrações, com o sistema-teste *A. cepa*, revelaram que a maior concentração inibiu a divisão

celular, como por exemplo: *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L. (TEIXEIRA *et al.*, 2003); *Pterocaulum polystachyum* D. C. (KNOLL *et al.*, 2006); *Achyrocline satureioides* Lam. (FACHINETTO *et al.*, 2007); *Solidago microglossa* D. C. (BAGATINI *et al.*, 2009); *Baccaris trimera* (Less) D. C. e *B. articulata* (Lam.) Pers. (FACHINETTO e TEDESCO, 2009); *Thuja occidentalis* L. (JORGE *et al.*, 2009); *Mikania glomerata* Spreng. (DALLA NORA *et al.*, 2010) e *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton (FRESCURA, 2012).

É possível que a alta concentração de alguns compostos tenha um efeito (inibitório ou estimulatório) no ciclo celular (FACHINETTO *et al.*, 2007). Alguns compostos podem ser responsáveis pela inibição da divisão celular e por aberrações cromossômicas, sendo assim, *Echinodorus grandiflorus* apresenta inúmeros compostos, que são descritos como possuindo atividade anti-inflamatória (DUTRA *et al.*, 2006), vasodilatador (ALMEIDA *et al.*, 2001; 2003) e anti-hipertensivos (ARAÚJO *et al.*, 2002), entre outras, o que pode explicar a diminuição dos valores dos índices mitóticos, quando utilizado em altas concentrações. No caso, a menor concentração estimulou a divisão celular e a maior inibiu.

Fachinetto *et al.* (2007), em seu trabalho com infusões de *Achyrocline satureioides*, verificou o efeito anti-proliferativo de infusões da referida planta sobre células de *A. cepa*, atribuindo esta observação à atividade dos diferentes compostos químicos presentes na infusão.

Analisando os extratos comerciais, proveniente de área cultivada, em ambas as concentrações, houve um aumento do IM em relação aos controles e ao extrato proveniente de áreas de ocorrência natural na concentração 24g. L⁻¹. Esse aumento do IM pode ser resultado de fatores ambientais diferenciados, os quais podem afetar a produção de compostos na planta. Segundo Gobbo-Neto; Lopes (2007), a taxa de produção de metabólitos secundários, compostos, pode ser coordenada ou alterada por diversos fatores, sendo que os principais são sazonalidade, ritmo circadiano, estádios de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.

Os índices mitóticos de *S. montevidensis*, coletada em Silveira Martins, nas duas concentrações estudadas, foram semelhantes, apresentando um aumento do IM em relação ao controle negativo. Enquanto que na coletada em Santa Maria, houve uma redução significativa do IM, em relação ao extrato de menor

concentração (6g. L^{-1}) e ao controle negativo. Essas diferenças podem estar relacionadas com a localização das populações, sendo uma de região rural (grupo experimental 1) e outra de uma região urbana e poluída (grupo 2), corroborando com Gobbo-Neto; Lopes (2007).

Em alguns casos, a produção de compostos químicos pelas plantas, metabólicos secundários, estão relacionados aos fatores externos em que elas possam estar submetidas. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, o que torna sua biossíntese frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Os efeitos mutagênicos em núcleos eucariotos podem ser verificados citologicamente pela observação da inibição de células em crescimento ou divisão, interrupção de metáfase ou indução de anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais (VIEIRA; VICENTINI, 1997; KNOLL *et al*, 2006).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos o dano é reparado pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (WHITE & RASMUSSEN, 1998; OBE *et al.*, 2004; KRÜGER, 2009).

Os extratos das duas espécies, *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*, pelo número significativo de alterações cromossômicas, possuem potencial genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*, sugerindo ação mutagênica.

De acordo com Ribeiro *et al.* (2003) o efeito mutagênico é a consequência de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos e biológicos, induzido por mutações nas células de um organismo. Já o efeito antimutagênico, tem ação inversa impedindo a formação das mutações causadas por um determinado agente mutagênico.

Segundo Von Borstel (1996), antimutagenicidade é a redução da taxa de mutações espontâneas e da frequência de mutações induzidas por agentes exógenos. Portanto, antimutagênico é todo agente que tem capacidade de reduzir a ocorrência de mutações.

Muitos estudos laboratoriais têm identificado um grande número de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos, a maioria presente nas plantas (DE MARINI, 1998; STURBELLE *et al*, 2010).

A atividade antimutagênica, das espécies, foi avaliada, no entanto, os extratos não apresentaram atividade antimutagênica, pois não reverteram os efeitos genotóxicos causados pelo glifosato (Tabela 2). Inclusive, em ambas as espécies, houve um aumento do número de células com alterações cromossômicas, principalmente de *E. grandiflorus* na concentração de 24g. L⁻¹.

Estudos realizados por Frescura (2012), mostraram que as espécies *Psychotria brachypoda* e *P. birotula* Smith & Downs não apresentaram atividade antimutagênica. Em contra partida, outras espécies estudadas e utilizadas na medicina popular apresentaram potencial antimutagênico, como *Aloe vera* (STURBELLE *et al.*, 2010), *P. guajava* e *A. millefolium* (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

3.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos, exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros e poluentes (BRUGIOLO, 2010).

Leite *et al.* (1998), analisaram a composição química de extratos aquosos bruto de *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, através de estudos cromatográficos, verificaram a ausência de alcalóides e a presença de cardenolídeos, cumarinas, flavonóides e a ocorrência abundante de terpenóides.

A análise CLAE revelou que os flavonóides e ácidos fenólicos estão presentes nos extratos aquosos de *E. grandiflorus* e *S. montevidensis*, de ambos os grupos experimentais. Flavonóides e ácidos fenólicos constituem o grupo dos compostos fenólicos. Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram sua capacidade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos que inibem a formação de radicais livres e estão presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (MORAIS *et al.*, 2009).

O ácido cafeico e o flavonóide glicosídeo foram os compostos encontrados em maior quantidade de *E. grandiflorus*, onde, apresentou 8,47% de ácido cafeico e 12,04% de flavonóide glicosídeo, para o extrato do grupo experimental 1, 8,01% e 9,38%, respectivamente, para o extrato do grupo 2. Enquanto que o extrato “comercial” apresentou 4,57% de ácido cafeico, 8,74% de flavonóide glicosídeo e 9,16% glicosídeo fenol. Essas diferenças corroboram com Brugiolo (2010), que a concentração dos compostos depende do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio.

Trabalhos conduzidos em *E. grandiflorus* evidenciaram que os principais constituintes químicos que já foram isolados da espécie são: ácido fenólico-ácido ferúlico, ácido cafeico e isoferulico (PIMENTA *et al.*, 2002 a, b); ácidos graxos (TANAKA, 2000); flavonóides (PIMENTA, 2002), entre outros.

Não eram conhecidos os compostos químicos de *S. montevidensis*. No presente trabalho quantificou-se 14,07% e 9,40% de glicosídeo fenol para os grupos 1 e 2, respectivamente. E ausência de flavonóide glicosídeo para o extrato aquoso do grupo experimental 1. No entanto, outras espécies de *Sagittaria* são conhecidas pela produção de compostos antibacterianos, como os diterpenóides (LIU *et al.*, 2007).

Athayde *et al.* (2000; 2007), analisando por CLAE amostras de folhas de *Ilex paraguariensis* de diferentes populações e de diferentes indivíduos da mesma população, reportaram não somente grande variabilidade interpopulacional nos teores de metilxantinas encontrados, mas também entre plantas dentro da mesma população.

4 CONCLUSÃO

E. grandiflorus apresenta potencial antiproliferativo com o aumento da concentração de seus extratos.

As diferentes populações testadas da espécie *S. montevidensis* mostra distintos efeitos genotóxicos e antiproliferativos, o que indica possível variabilidade genética dos indivíduos coletados e interação dos fatores externos interferindo na produção de compostos.

Os extratos de ambas as espécies possuem potencial de genotoxicidade determinado pelo aparecimento de alterações cromossômicas.

Os compostos que estão presentes em maior quantidade nos extratos de *E. grandiflorus* são o ácido cafeico e o flavonóide glicosídeo e em *S. montevidensis* o glicosídeo fenol.

E. grandiflorus e *S. montevidensis* não apresentam potencial de antimutagenicidade.

Salienta-se que são necessários mais estudos que permitam a obtenção de maior quantidade de dados sobre essas espécies que levam ao uso seguro das mesmas para inibição da divisão celular em células eucariontes, o que o presente estudo mostra, pois *E. grandiflorus* e *S. montevidensis* podem ser utilizadas para pesquisas futuras com esse propósito.

BIBLIOGRAFIA

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia Aquática – **Toxicidade Aguda** – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro. 17 p. 2004.
- ALBERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extract: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, V. 1172, n. 1, p.1-8, 2007.
- ALMEIDA, A. L. F.; PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇA, E. Investigação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito vasodilatador de extrato bruto aquoso de *Echinodorus grandiflorus* na aorta isolada de coelho. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXXV, Águas de Lindóia/SP, 2003. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, p. 116. 2003.
- ALMEIDA, A. L. F.; RAVAGLIA, P. C.; PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇA, E. Efeito vasodilatador das frações do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* na aorta isolada de coelhos. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, XVI, Caxambu, MG, 2001. **Anais...** Caxambu: FeSBE, p. 11. 2001.
- ANDRADE, M. A.; MARANHO, L. T.; PREUSSLER, K. H.; CUBAS, S. Organização estrutural da raiz e folha de *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht Alismataceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 117-119, jul. 2007.
- ARAÚJO, C. V.; MATOS, C. S.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇA, E. Efeitos cardiovasculares do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos hipertensos. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXXIV, 2002, Águas de Lindóia/SP. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, p. 211. 2002.
- ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E.P. Populational diversity on methylxanthines content of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.2, p.275-279, 2007.
- AYRES, M. Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil **Mamirauá**, Brasília: CNPq, 290p. 2007.

- BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO S. B. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, p. 632-636. 2009.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, 17(3):444-7. 2007.
- BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. Distribuição geográfica e composição química do chapéu-de-couro (*Echinodorus spp.*) no Rio grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 213-218, 2001.
- BRUGIOLO, S. S. S. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) em ratas prenhes. 2010. 86f. **Tese** (Doutorado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.
- CABRERA, G. L., RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Research.**, v.426, p. 211-214. 1999.
- CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA R. O.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genet Mol Biol**, v.25, p.85-89. 2002.
- CARITÁ, R. & MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72: 722-725. 2008.
- COMIOTTO, A. M. S., Potencial alelopático de diferentes espécies de plantas sobre a qualidade fisiológica de sementes de arroz e aquênios de alface e crescimento de plântulas de arroz e alface. 2006. VVf. **Dissertação** – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Nov. 2006.
- CORREA JR., C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2ª Ed. Jaboticabal: FUNEP, 162 p. 1991.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 707p. 1984.

- COSTA, Y. J.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismatales) with chromosomal banding and 45S DNAr FISH. **Plant Systematics and Evol.** 257:119-127. 2006.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** Nova York. The New York Botanical Garden. 2 ed. p. 555. 1988.
- DALLA NORA, G.; PASTORI, T.; LAUGHINHOUSE IV, H. D.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, Mendoza, v. 34, p. 85-101. 2010.
- DE LUCA, R. L. Padronização genética e cultivo controlado de *Echinodorus grandiflorus* Micheli para a produção de fitoterápico. 2003. 157p. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- DE MARINI, D.M. **Dietary interventions of human carcinogenesis.** Mutat Res 400: 457-465. 1998.
- DI STASI, L. C. L. C. (Org.). **Planta medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 1996.
- DIANA, F.; FERNANDÉZ, V.; TORRES, E. Evaluacion de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del Dpto. Central de la region oriental. **Revista de Ciencia y Tecnologia**, v. 2. p. 37-48, 2000.
- DUTRA, R. C.; TAVARES, Z. C.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(4): 469-474. 2006.
- FACHINETTO, J.M. e TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutag nica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Rev. bras. plantas med.**, vol.11, no.4, p.360-367. 2009.
- FACHINETTO, J.M; BAGATINI, M.D; DURIGON, J; SILVA, A.C.F; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satuireioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.17, p.49-54, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, Brasil. 904p., 2v/il. 2010.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, n.1, p.81-91. 2006.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v.72, p.774-778, 2001.

FISKEJO, G. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Root Tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, 9: 235-241. 1994.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the Firstten MeIC Chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, New York, v. 21, p.139 – 149, Dec. 1994.

FRESCURA, V. D. S. Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae). 2012. Xf. **Dissertação** (Mestrado em Agrobiologia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2012.

GADANO A.; GURNI, A.; LOPÉZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11-16, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, vol.30, n2, p.374-381, 2007.

GOMES, S. V. F. Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer/ Silvana Vieira Floresta Gomes. **Dissertação**-Universidade Federal de Sergipe- São Cristóvão, 139f. 2009.

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

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 52, n. 6, p. 481- 504, 2000.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. The Alismataceae. **Flora Neotropica** - Monograph 64. New York: The New York Botanical Garden, 109 p. 1994.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Notes on *Echinodorus*** (Alismataceae). *Brittonia*. p. 325-332 v. 38. 1986.

HAYNES, R. R.; LES, D. H.; HOLM-NIELSEN, L. B. **Alismataceae** Em: KUBITZKI, K. The Families and Genera of Vascular Plants-Flowering Plants Monocotyledons Alismatanae and Commelinanae (Except Graminae). Alemanha. Springer. p. 11-15 v. 4. 1998.

HENDRINKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; BONT, D. D.; HALL, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.

KUTCHAN, T. M. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-62, 2001.

JIANG, Y.; LI, S. P.; WANG, Y. T.; CHEN, X. J.; TU, P. F. Differentiation of Herba Cistanches by *fingerprint* with high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216:2156-2162, 2009.

JORGE, V. R.; PRANDINI, E. V.; KARSBURG, I. V. **Citotoxicidade de *Allium cepa* em diferentes concentrações de Tuia (*Thuja Occidentalis*)**. 2ª Jornada Científica da Unemat. 2009.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. Sunderland. Sinauer Associates, Inc. 3 ed. p. 249-254. 2008.

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

KRÜGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa* / **Dissertação** (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Feevale, Novo Hamburgo-RS, 43 f.: 2009.

LAINETTI, R.; BRITO, N.R.S. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Ediouro, 120p. 1980.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso**. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4o PDPETRO, Campinas, SP, p. 21-24. 2007.

LEITE, S. N.; FLORIANI, A. E.; BIAVATTI, M.W.; CECHINED, F, V. Parâmetros fitoquímicos, físico-químicos e anatômicos para o controle de qualidade do chapéu de couro (*E.grandiflorus x macrophyllus*, Alismatacea). **Resumo do X Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, SP. 1998.

LESSA, M. A.; ARAÚJO, C.V.; KAPLAN, M. A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇA, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundam Clin Pharmacol**. 22(2):161-8. 2008.

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

LIMA, E. da C. Análise química e genotóxica de *Echinodorus grandiflorus*: suporte biotecnológico na preparação farmacêutica de extratos vegetais seguros para uso medicinal. 2006. 124f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

LIU, X. T.; SHI, Y.; YU, B.; WILLIAMS, I. D.; SUNG, H. H. Y.; ZHANG, Q.; LIANG, J.Y.; IP, N. Y.; MIN, Z. D. **Planta Medica**, 73, 84. 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2000a.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2000b.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa : UFV, 220p. 1995.

MITTEREGGER-JÚNIOR, H., FERRAZ-DIAS, J., LÚCIA-YONEMA, M., ARENZON, SILVA, J. & PEGAS-HENRIQUES, J. A. Avaliação das águas tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha, Região coureira calçadista, utilizando *Allium cepa*. **J. Braz. Ecotoxicol.**, 1 (2): 147-151. 2006.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. Bras.Farmacogn.** v.19, n.1b, p.315-320, 2009.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G. *et al.* Manual de manejo do herbário fânerogâmico, Ilhéus: **CEPLAC**, 104 p. 1989.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, Orlando, v. 504, n.5, p. 17-36, Oct. 2004.

PAIVA, S. R. de; FOUTOURA, L de A.; FIGUEIREDO, M. R. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. **Quim. Nova**, Vol. 25, N°5, 717-721, 2002.

PIMENTA, D. S. Contribuição ao cultivo, ecologia e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (chapéu de couro). 2002. 179f. **Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltldl.) Micheli. I- Interface de perfis cromatográficos obtidos po CG-EM e CLAE-UV de extratos apolares e polares de folhas. **In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 2002, Cuiabá, MT. Resumo do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá, Mt, 2002a.

PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) (Micheli). II- Análise por CLAE-UV de extratos aquosos e etanólicos de folhas coletadas sazonalmente. **In:** XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá, MT. Resumo do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá, MT, 2002b.

PONS, A. H.; PINTO, L.M.O.I. Citotoxicidade na doença de Chagas. Acessado em 09.04.2013. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>. 2013.

POTT, V. J.; POTT, A. Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília: **EMBRAPA**, 404p. 2000.

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

REGO, S. C. A. Alismataceae no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 128 p. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1988.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas-RS, ULBRA. p 356. 2003.

SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; HAMID, A.; KHAN, M. Q.; ATHAYDE, M.L. SANTOS, D.B.; BOLIGON, A.A.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, 741-747, 2012.

SAMPAIO, F.A. Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT -31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2012.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SILVA, C.R., MONTEIRO, M.R., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A., BEZERRA, R.J.A.C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Rev Bras Farmacogn**, v.14, p. 1-3. 2004.

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

SILVA-JR., A. A.; VIZZOTTO, V.J.; GIORGI, E.; MACEDO, S.G. & MARQUES, L.F. Plantas medicinais, caracterização e cultivo. Florianópolis: **EPAGRI**, 71p. (Boletim Técnico, 68). 1994.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Non-ionic samples: reversed and normal phase HPLC. **In: Practical HPLC method development**. New York: wiley; p. 233-291. 1997.

SOUZA, L. F.; IV LAUGHINGHOUE, H. D., PASTORI, P.; TEDESCO, M. T.; KUHN, A. W.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies** 67: 871-877. 2010.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S de; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R. de; GARCIAS, G. de L.; MARTINO-ROTH, M. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. Bras. de Farmacognosia**. Brazilian Journal of Pharmacognosy 20(3): 409-415, Jun./Jul. 2010.

TANAKA, C. M. A. Constituintes Químicos de Cinco Espécies de *Echinodorus* e Avaliação do Beta Pineno como Substrato para Obtenção de Quirons mais Elaborados. **Tese de Doutorado da Universidade Estadual de Campinas**, Instituto de Química. p. 298. 2000.

TANAKA, C. M. A.; RADKE, V. S. C. O.; SILVA, C. C. da; NAKAMURA, C. V.; OLIVEIRA, P. L.; KATO, L.; OLIVEIRA, C.M. A. de. Abietatrienes diterpenoids from *Sagittaria montevidensis* SSP *Montevidensis*. **Quím. Nova** [online]., vol.33, n.1, pp. 30-32. 2010.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* test, **Environmental Contamination**, Dr. Jatin Srivastava (Ed.), ISBN: 978-953-51-0120-8, InTech, DOI: 10.5772/31371. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test> 2012.

TEIXEIRA, R.O., CAMPAROTO, M.L., MANTOVANI, M.S., VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genet Mol Biol**, v. 26, p. 551-555. 2003.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutat Res.**, Madrid, v. 410, p. 223-236, Jan. 1998.

VICENTINI, V.E.P., CAMPAROTO, M.L., TEIXEIRA, R.O., MANTOVANI, M.S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598. 2001.

VIEIRA, D.; VICENTINI, V. E. P. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa*. **Genet Mol Biol Supplement**. 42º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brazil. 1997.

VON BORSTEL, R. C. The relation of activation and inactivation to antimutagenic process. In: Shankel, D. M.; Hatman, P. E.; Kada, T.; Hollaender, A. (Ed.) Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms. New York: Plenum Press, p.39-45, 1996.