

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO,  
GENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DAS ESPÉCIES  
*Psychotria brachypoda* (MÜLL. ARG.) BRITON E  
*Psychotria birotula* SMITH & DOWNS (RUBIACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Viviane Dal-Souto Frescura**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO,  
GENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DAS ESPÉCIES  
*Psychotria brachypoda* (MÜLL. ARG.) BRITON E *Psychotria  
birotula* SMITH & DOWNS (RUBIACEAE)**

**Viviane Dal-Souto Frescura**

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Bosio Tedesco**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

F884a Frescura, Viviane Dal-Souto

Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae) / por Viviane Dal-Souto Frescura. – 2012.

73 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Solange Bosio Tedesco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2012

1. Antiproliferativo 2. Genotóxico 3. Alelopático 4. *Psychotria brachypoda*  
5. *Psychotria birotula* 6. Antimutagênico I. Tedesco, Solange Bosio II. Título.

CDU 581

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109  
Biblioteca Central UFSM

---

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Viviane Dal-Souto Frescura. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

---

**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**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO  
E ANTIMUTAGÊNICO DAS ESPÉCIES *Psychotria brachypoda*  
(MÜLL. ARG.) BRITON E *Psychotria birotula* SMITH & DOWNS  
(RUBIACEAE)**

elaborada por  
**Viviane Dal-Souto Frescura**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)**

**Thais Scott do Canto Dorow, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 17 de janeiro de 2012.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais **Ademir** e **Maria**, minha irmã **Kelen** e ao meu noivo **Juliano**, por tudo o que passamos e pelos momentos que precisei me ausentar para realizar mais este sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que se fez presente em todos os momentos de minha vida, sempre me guiando pelo melhor caminho e me fazendo chegar até esse momento tão sonhado e tão especial.

Aos meus Pais, Ademir e Maria, que sempre me incentivaram em meus estudos e que são meus exemplos, é neles que me espelho para seguir minha caminhada em busca da realização de meus sonhos e espero poder orgulhá-los sempre.

À minha querida irmã Kelen que se fez presente em momentos fáceis e difíceis sempre com muita dedicação e compreensão, espero ser seu espelho e te ajudar muito daqui para frente, pois você foi um dos pilares dessa conquista.

Ao meu noivo Juliano, que sempre esteve presente nessa caminhada, aceitando e respeitando os momentos que precisei estar ausente, momentos estes que foram muitos. Amo-te muito e tenha essa conquista como sua também.

À minha Professora e Orientadora Solange, que se dedicou incansavelmente na realização desse trabalho estando sempre disposta a me auxiliar nos momentos de aflições e dúvidas. Agradeço por ter sido uma grande amiga a quem tomarei como exemplo no decorrer de minha trajetória.

Aos demais mestres do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, que muito contribuíram com minha formação e que fizeram e fazem um ótimo trabalho. A vocês mestres queridos, tenho amizade, respeito e gratidão.

A todos os meus colegas do LABCITOGEN, em especial à Andrielle, Marília, Ana Paula, Graciele e Tamara que além de colegas se tornaram grandes amigas.

Aos colegas do Mestrado em Agrobiologia, pelo carinho, amizade e companheirismo durante a rotina de aulas e experimentos. Nessa caminhada nos tornamos grandes amigos, compartilhamos tantos momentos de aflição, dúvidas, tristezas e muitas alegrias, e por estarmos passando pelos mesmos medos sempre nos entendemos. Que bom que chegamos juntos até esse momento tão especial em nossas vidas.

À minha tia de coração Maria pelo apoio, e a todos que fazem ou fizeram parte dessa realização.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

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

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, GENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DAS ESPÉCIES *Psychotria brachypoda* (MÜLL. ARG.) BRITON E *Psychotria birotula* SMITH & DOWNS (RUBIACEAE)**

AUTORA: VIVIANE DAL-SOUTO FRESCURA  
ORIENTADOR: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de janeiro de 2012.

Espécies do gênero *Psychotria* L. são utilizadas na medicina popular brasileira, na forma de chá, porém, 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 a ação sobre os organismos vivos. Para monitorar substâncias tóxicas e alelopáticas são muito utilizados ensaios biológicos com espécies vegetais como organismos alvo. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico de extratos das folhas de *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Briton e *Psychotria birotula* Smith & Downs sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L., além do potencial antiproliferativo e genotóxico sobre a germinação de sementes e ciclo celular de *Eruca sativa* Mill. Para isto, foram utilizadas folhas secas para preparar extratos em duas concentrações para cada espécie: 5g.L<sup>-1</sup> e 20g.L<sup>-1</sup>, sendo utilizada água destilada como controle negativo e o glifosato 3% como controle positivo. Para a análise do potencial antiproliferativo sobre a germinação (potencial alelopático) analisou-se as variáveis: número total de sementes germinadas, comprimento das raízes das plântulas, índice da velocidade de germinação e porcentagem de germinação. Para avaliação do potencial genotóxico, antiproliferativo e antimutagênico sobre o ciclo celular, tanto para o teste com *A. cepa* quanto com *E. sativa* foram analisados o índice mitótico e o número de alterações cromossômicas. Os extratos de *P. brachypoda* não apresentaram potencial genotóxico, já os extratos de *P. birotula* foram genotóxicos sobre o ciclo celular de *A. cepa*. Os extratos de *P. brachypoda* e *P. birotula* não apresentaram potencial antimutagênico, no entanto, demonstraram potencial antiproliferativo genotóxico sobre germinação e ciclo celular de *E. sativa*.

**Palavras-chave:** Antiproliferativo. Genotóxico. Alelopático. *Psychotria brachypoda*.  
*Psychotria birotula*.



## ABSTRACT

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

### **EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, GENOTOXIC AND ANTIMUTAGENIC POTENTIAL OF THE SPECIES *Psychotria brachypoda* (MÜLL. ARG.) BRITON E *Psychotria birotula* SMITH & DOWNS (RUBIACEAE)**

AUTHOR: VIVIANE DAL-SOUTO FRESCURA  
ADVISER: SOLANGE BOSIO TEDESCO  
Santa Maria January 17, 2012.

Species of the genus *Psychotria* L. are used in Brazilian folk medicine as tea, however, their indiscriminate and uncontrolled use can cause more harm than good to health. It is important to understand these plants, from their cellular levels to the action on living organisms, and for monitoring toxic substances allelopathic bioassays are widely used with plant species as the target organisms. This study aimed to evaluate the genotoxic, antiproliferative and antimutagenic potential of infusions of *Psychotria brachypoda* (Muell. Arg.) Briton and *Psychotria birotula* Smith & Downs on the cell cycle of *Allium cepa* L., in addition to analyzing the antiproliferative and genotoxic potential on the germination on seeds and cell cycle of *Eruca sativa* Mill. For this, dried leaves were used to prepare extracts in two concentrations for each species: 5g.L<sup>-1</sup> and 20g.L<sup>-1</sup>, using distilled water as a negative control and glyphosate 3% as a positive control. For the study, antiproliferative on the germination (allelopathic potential) variables were analyzed: total number of germinated seeds, seedling root length, index of germination rate, and germination percentage. To evaluate the genotoxic, antiproliferative and antimutagenic potential, both for the test with *A. cepa* and with *E. sativa* were analyzed mitotic index and the number of chromosomal alterations. The extracts of *P. brachypoda* have no genotoxic potential, though the extracts of *P. birotula* possess genotoxic potential on the *A. cepa* cell cycle and the extracts of *P. brachypoda* and *P. birotula* showed no antimutagenic potential, no entanto, apresentaram genotóxico, and antiproliferative potential on the germination and cell cycle *E. sativa*.

**Key words:** Antiproliferative. Genotóxic. Allelopathic. *Psychotria brachypoda*.  
*Psychotria birotula*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ensaio biológico com bulbos de *Allium cepa*.....23

Figura 2 – Ensaio biológico com semetes de *Eruca sativa*.....23

### ARTIGO 1

Figura 1 – Cells of *Allium cepa* submitted to the distinct treatments. A) Cell in metaphase with laggard chromosome submitted to the treatment with leaf extract of *Psychotria birotula* 5g.L<sup>-1</sup>; B) Cell with anaphasic bridges submitted to the treatment with *P. birotula* 20g.L<sup>-1</sup>; C) Cell with anaphasic bridges submitted to the leaf extract of *P. brachypoda* 5g.L<sup>-1</sup>; D) Cell with telophasic bridges submitted to the treatment with glyphosate 3%; E) Cells in telophase with chromosomal breakage submitted to the treatment of glyphosate 3% + 24hrs recovery in leaf extract of *P. birotula* 5g.L<sup>-1</sup>; F) Cells in apoptosis submitted to the treatment of glyphosate 3% + 24hrs recovery in leaf extract of *P. brachypoda* 20g.L<sup>-1</sup>.....43

### ARTIGO 2

Figura 1 – Comparison of the mean root length, germination velocity index (GVI), percentage of germination (%G) and mitotic index (MI) in each treatment.....63

Figura 2 – Meristematic root cells of *Eruca sativa* submitted to treatments. A) cells in interphase submitted to the treatment with the leaf extract of *Psychotria brachypoda* at 5g.L<sup>-1</sup>; B, C) cells in metaphase submitted to the leaf extract of *P. brachypoda* at 20g.L<sup>-1</sup>; D) cell in telophase submitted to the leaf extract of *P. birotula* at 20g.L<sup>-1</sup>; E) cell in prophase irregular submittes to the extract of *P. birotula* at 5g.L<sup>-1</sup>.....64

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Tabela 1 – Number of cells in interphase, mitosis, and the mitotic index of the *Allium cepa* root-tips for each treatment.....41
- Tabela 2 – Number of cells with chromosomal alterations and the types of alterations that occurred in each of the treatments .....42

### ARTIGO 2

- Tabela 1 – Comparison of the mean root length, germination velocity index (GVI) and percentage of germination (%G) in each treatment.....58
- Tabela 2 – Comparison among the means of germination of the contrasts (c) between 24, 48, and 72 hours and the significance of the estimated contrast.....59
- Tabela 3 – Number of cells in interphase, mitosis, and mitotic (MI) index of root-tips of *Eruca sativa* for each treatment.....60
- Tabela 4 – Number of cells with chromosomal alterations in the root-tips of *Eruca sativa* for each treatment.....61
- Tabela 5 – Chi-square ( $\chi^2$ ) values for the comparisons between the Mitotic Index (MI) of each treatment and between the number of chromosomal alterations.....62

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
Família Rubiaceae.....	17
Gênero <i>Psychotria</i> L.....	17
A medicina popular e as espécies do gênero <i>Psychotria</i> .....	18
<i>Psychotria brachypoda</i> (Müll. Arg.) Britton.....	19
<i>Psychotria birotula</i> Smith & Downs.....	20
Espécies vegetais como organismo alvo.....	20
<b>ARTIGO 1 – Evaluation of the antiproliferative, genotoxic and antimutagenic potential of the species <i>Psychotria brachypoda</i> (Müll. Arg.) Britton and <i>Psychotria birotula</i> Smith &amp; Downs (Rubiaceae) on the <i>Allium cepa</i> L. (Amaryllidaceae) cell cycle</b> .....	24
<b>Abstract</b> .....	25
<b>Introduction</b> .....	26
<b>Materials and methods</b> .....	28
<b>Results</b> .....	30
<b>Discussion</b> .....	34
<b>Acknowledgments</b> .....	37
<b>References</b> .....	38
<b>ARTIGO 2 – Evaluation of the antiproliferative and genotoxic potential of the species <i>Psychotria brachypoda</i> (Müll. Arg.) Britton and <i>Psychotria birotula</i> Smith &amp; Downs (Rubiaceae) on the germination and cell cycle of <i>Eruca sativa</i> Mill. (Brassicaceae)</b> .....	44
<b>Abstract</b> .....	44
<b>Introduction</b> .....	46
<b>Materials and methods</b> .....	47
Sapling of plant material.....	47

Extract preparation.....	48
Biological assay.....	48
Mitotic index (MI).....	48
Statistical analysis.....	49
<b>Results and Discussion</b> .....	49
<b>Acknowledgments</b> .....	54
<b>References</b> .....	55
<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## INTRODUÇÃO

O germoplasma de espécies medicinais no Brasil possui potencial econômico, constituindo-se dessa maneira em riqueza de recursos a ser preservada e utilizada, tornando-se cada vez mais uma forma de terapia alternativa acessível para o uso da população em geral, no entanto é necessário conservar sua diversidade genética vegetal. Para isso, são imprescindíveis trabalhos que permitam a caracterização dessas plantas nos mais diversos níveis, sejam eles agronômicos ou biológicos.

No Rio Grande do Sul, muitas espécies de plantas medicinais são utilizadas na medicina popular, mas o seu uso indiscriminado e sem controle pode causar mais danos à saúde da população do que benefícios, sendo necessário ter-se o conhecimento dessas plantas, desde os níveis celulares até a sua ação sobre os organismos vivos.

Segundo Vieira e Vicentini (1997) para informar a respeito de possíveis alterações ocorridas pela presença de substâncias mutagênicas na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo são utilizados estudos citogenéticos em núcleos eucarióticos. Os efeitos mutagênicos podem ser detectados citologicamente pela inibição celular, interrupção em metáfases, indução de aberrações cromossômicas, numérica e estrutural e de trocas entre cromátides irmãs e outros.

Assim, Vicentini et al. (2001) relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Porém, segundo Silva et al. (2004), o consumo de chás pela população pode suprimir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano.

Ensaio biológicos utilizando espécies vegetais como organismos alvos são utilizados para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas e têm sido incorporados à identificação e monitoramento de substâncias tóxicas (NOLDIN et al., 2003).

Dentre os ensaios biológicos vegetais destaca-se o teste de *Allium cepa* L. (cebola), utilizado para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007), sendo que o método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e

monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA E RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004).

Leme e Marin-Morales (2009) registraram que estudos da sensibilidade e correlação do sistema teste de *A. cepa* e outros sistemas testes são fundamentais para avaliação mais precisa dos riscos ambientais, assim como a extrapolação dos dados para outros organismos, como o homem.

O teste de *A. cepa* tem sido utilizado para monitorar a ação dos extratos de plantas medicinais como, por exemplo, *Maytenus ilicifolia* Mart. (*cancorosa*), *Bauhinia candicans* Benth. (pata-de-vaca) (CAMPAROTO et al., 2002), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Achillea millefolium* L. (mil folhas) (TEIXEIRA et al., 2003), *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela) (FACHINETTO et al., 2007), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) (DALLA NORA et al., 2010) dentre outras.

Além da avaliação dos extratos pelo teste de *A. cepa*, várias espécies medicinais e outras espécies vegetais já foram testadas quanto seu potencial antiproliferativo sobre a germinação de sementes, ou seja, alelopatia, através de ensaios biológicos, e dentre elas cabe citar: *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt. (leucena) (PRATES et al., 2000); *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (capim-cidreira) e *Stevia rebaudiana* (Bert.) (estévia) (SOUZA et al., 2005); *Arctium minus* (Hill.) Bernh. (bardana) (BELINELO et al., 2008); *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (fruta-do-lobo), *Solanum subumbellatum* Vell. (jurubebinha), *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (fumo bravo) (OLIVEIRA, 2009), *Ruta graveolens* L. (arruda) (DE FEO et al., 2002), *Salvia officinalis* L. (salvia) (VIECELLI e CRUZ-SILVA, 2009), *Vernonia tweediana* Baker. (assa-peixe) (OLGUIN et al., 2005).

Nos estudos sobre a alelopatia são utilizadas sementes de espécies como *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (sorgo), sementes de *Cucumis sativus* L. (pepino) (BELINELO et al., 2008), sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), *Eruca sativa* Mill. (rúcula) (SOUZA et al., 2005) e de *Sesamum indicum* L. (gergilim) (OLIVEIRA, 2009).

Estudos sobre o efeito antiproliferativo, genotóxico, antimutagênico e alelopático de extratos de plantas medicinais devem ser priorizados, pois dessa maneira estarão sendo investidos esforços de pesquisa visando à saúde da população e a preservação do meio ambiente.



Pela inexistência de estudos que informem sobre os efeitos antiproliferativo, genotóxico, antimutagênico e alelopático de *P. brachypoda* e *P. birotula*, faz-se necessário a realização de pesquisas que promovam o conhecimento científico destas espécies. Trabalhos envolvendo a genotoxicidade de plantas medicinais são de extrema importância, tendo em vista que podem alertar a população sobre possíveis e eventuais danos causados a organismos alvo por substâncias presentes nos chás, já que estas substâncias muitas vezes são também utilizadas em formulações de fármacos; o efeito antiproliferativo pode informar a respeito da capacidade de uma substância inibir a proliferação de células cancerígenas; o efeito antimutagênico informa sobre a capacidade de uma substância inibir a ação de mutagênicos e, a avaliação do efeito alelopático, poderá auxiliar na descoberta de novas substâncias para serem utilizadas como herbicidas naturais, como mecanismo menos prejudicial ao meio ambiente.

Dessa forma, o presente estudo visa avaliar o potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico de extratos das folhas de *P. brachypoda* e *P. birotula* sobre o ciclo celular de *A. cepa* (artigo 1), além de avaliar o potencial antiproliferativo e genotóxico dos extratos sobre a germinação de sementes e ciclo celular de *E. sativa* (artigo 2).

## REVISÃO DE LITERATURA

### Família Rubiaceae

Em 1988, Robbrecht propôs a divisão de Rubiaceae em quatro subfamílias, 44 tribos, 628 gêneros e 10.700 espécies. As quatro subfamílias estabelecidas por Robbrecht foram Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae.

As espécies da família Rubiaceae são consideradas cosmopolitas, a maioria árvores tropicais de grande, médio ou pequeno porte, porém são encontradas também como arbustos ou ervas (ROBBRECHT, 1988).

Estudos quimiotaxonômicos realizados por Lopes (1998) indicam que as espécies da família Rubiaceae apresentam um padrão de tendência evolutiva representado pelo acúmulo de grupos distintos de iridóides: gardenosídeo, genopsídeo e ixorosídeo (subfamília Ixoroideae), loganina, secoiridóides e/ou alcalóides indólicos monoterpênicos (subfamílias Antirheoideae e Cinchonoideae), asperulosídeo ou ácido deacetilasperulosídico (subfamília Rubioideae).

A família Rubiaceae é rica em gêneros de uso medicinal, entre os quais está o gênero *Psychotria* (ADJIBADÉ, 1989 *apud* PARANHOS, 2003) e várias espécies da subfamília Rubioideae são conhecidas pelo acúmulo de alcalóides indólicos monoterpênicos em níveis relativamente altos (ROBERTS e STRACK, 1999).

### Gênero *Psychotria* L.

*Psychotria* é o maior gênero de Rubiaceae, pertencente à subfamília Rubioideae e tribo Psychotrieae, engloba cerca de 1650 espécies no mundo todo, a maioria de hábito arbustivo, embora árvores, ervas, lianas e epífitas também sejam conhecidas. Está constituído de três subgêneros, considerando caracteres morfológicos e distribuição geográfica: *Psychotria*, *Heteropsychotria* e *Tetramerae* (NEPOKROEFF et al., 1999).

No Rio Grande do Sul foi constatada a presença de dez espécies do gênero *Psychotria*: *P. carthagenensis* Jacq., *P. birotula* Smith & Downs, *P. myrianta* Mull. Arg., *P. nitidula* Cham. Et Schlecht, *P. brachyceras* Mull. Arg., *P. tenerior* (Cham.) Mull. Arg., *P. kleinni* Smith & Downs, *P. suterella* Mull. Arg., *P. brachypoda* (Müll.

Arg.) Britton (*P. umbellata* Vell.) e *P. leiocarpa* Cham. Et Schlecht (DILLENBURG e PORTO, 1985).

Fatores que despertam interesse para o estudo de espécies de *Psychotria* são a importância na medicina tradicional. (ADJIBADÉ, 1989 *apud* PARANHOS, 2003; LAJIS ET AL., 1993) e a produção de alcalóides pelas espécies do gênero *Psychotria*. Estudos indicam que espécies de *Psychotria* encontradas no sul do Brasil produzem alcalóides do tipo monoterpene indólicos, alguns deles com interessantes atividades biológicas e oriundos de novas rotas biossintéticas. *P. leiocarpa* acumula N, b-D-glicopiranosilvincosamida (GPV), o primeiro alcalóide N-glicosilado desta classe a ser descrito. o extrato contendo GPV apresenta atividade analgésica inespecífica e, na planta, sua biossíntese é regulada pelo desenvolvimento e por luz, *P. brachypoda* produz o alcalóide psicolatina, que apresenta alto potencial farmacológico (FRAGOSO, 2007) e *P. birotula*, acumula os alcalóides do tipo pirrolodino indólico, meso-chimonantina e chimonantina, também de utilização farmacológica (BRAND et al., 2009).

### **A medicina popular e as espécies do gênero *Psychotria***

Desde os primórdios da civilização, com as práticas nômades e, posteriormente com o advento e desenvolvimento da agricultura que permitiu a fixação de grupos populacionais em determinadas regiões não precisando recorrer às migrações para a sobrevivência, o manejo do meio ambiente permitiu ao homem adquirir uma relação muito intensa com as plantas, não apenas para a obtenção de alimentos para suprir as necessidades básicas da população ou de material para abrigo temporário, mas também, utilizando sua intuição e inteligência passou a diferenciar as espécies vegetais que eram tóxicas, medicinais ou alimentícias (ENGELKE, 2003).

De acordo com o Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines (ZHANG, 1998), a Organização Mundial de Saúde define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” e, segundo Martins et al. (2000) no Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta influências da cultura indígena, africana e européia.

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., 2000).

No Brasil, é provável que das cerca de 200.000 espécies vegetais existentes, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, porém, nem 1% foi estudado adequadamente (MARTINS et al., 2000).

As espécies do gênero *Psychotria* são muito utilizadas pela população na forma de infusões e com aplicações externas, sendo que os usos internos de infusões mais freqüentes são indicados para afecções do aparelho reprodutor feminino, auxiliar no pré e pós-parto, nas doenças brônquicas e nos distúrbios gastrointestinais. Na utilização externa, em aplicações cutâneas, tumores, úlceras, distúrbios oculares, como cataplasmas e banhos no tratamento de febre, dores de cabeça e de ouvido (ADJIBADÉ, 1989 *apud* PARANHOS, 2003; PERRY, 1980; LAJIS et al., 1993)

### ***Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton.**

*P. brachypoda* é uma arvoreta de 1 a 3 metros de altura comumente encontrada em florestas tropicais e subtropicais do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, no limite sul da Floresta Tropical Atlântica, (DILLENBURG e PORTO, 1985).

A espécie apresenta ramos subcilíndricos, oliváceo-foscas, em regra tricotomicamente ramificados e entrenós com cerca de 2 a 6mm. Folhas pecioladas com 5 a 8 nervuras secundárias de cada lado, proeminentes, glabras (DELPRETE et al., 2005).

É conhecida popularmente pelos nomes vulgares pimenteira-miúda e erva-de-rato (DELPRETE et al., 2005)

*P. brachypoda* produz o alcalóide psicolatina, com alto potencial farmacológico, pois apresenta atividade analgésica do tipo opióide, ansiolítica e antipsicótica, interagindo com receptores de diversos sistemas de neurotransmissores no sistema nervoso central (FRAGOSO, 2007).

Fragoso et al. (2008) estudaram o efeito do extrato foliar de *P. brachypoda* no crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* e observaram que houve redução dos

índices mutagênicos induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de psicolatina e dos extratos foliares de *P. brachypoda* devido a alta concentração de psicolatina nas folhas desta espécie e as concentrações que apresentaram ação antimutagênica do extrato foram similares às de psicolatina purificada. Ainda nesse estudo, os resultados indicados mostraram novas propriedades para a psicolatina e *P. brachypoda*, que apresentaram potencial nas aplicações farmacêuticas de produtos solares, cosméticos e antioxidantes.

### ***Psychotria birotula* Smith & Downs**

*P. birotula*, é um arbusto de até 1,5 m de altura, com ramificações desde 0,30 m do solo. Apresenta caules roliços, glabros, os mais novos levemente compridos e muito quebradiços. Folhas pecioladas com 7 a 11 nervuras secundárias em cada lado, nítidas em ambas as faces. A espécie ocorre abundantemente na mata pluvial costeira, no município de Torres, no Rio Grande do Sul (DILLENBURG e PORTO, 1985; DELPRETE et al., 2005).

É conhecida pelos nomes vulgares Maria-mole, erva-de-anta e pasto-de-anta (DELPRETE et al., 2005).

Em estudo realizado por Brand et al. (2009) foram isolados de *P. birotula* os alcalóides do tipo pirrolodino indólico, meso-chimonantina e chimonantina, com utilização farmacológica.

### **Espécies vegetais como organismo alvo**

Ensaio biológicos utilizando espécies vegetais como organismos alvo são utilizados para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas e têm sido incorporados à identificação e monitoramento de substâncias tóxicas (NOLDIN et al., 2003).

Algumas espécies vegetais são utilizadas como organismos alvo, e alguns exemplos são: bulbos de *A. cepa* (LEVAN, 1938; FISKESJÖ, 1985; TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007) (Figura 1), sementes de *S. bicolor* (sorgo), sementes de *C. sativus* (pepino) (BELINELO et al., 2008), sementes de *L. sativa* (alface), *E. sativa* (rúcula) (SOUZA et al., 2005) (Figura 2) e de *S. indicum* (gergilim) (OLIVEIRA, 2009).

Os ensaios biológicos podem ser feitos em papel filtro, substrato inerte, hidroponia ou solo no caso das sementes (WEIDENHAMER et al. 1989). Os parâmetros avaliados tipicamente são a germinação e o comprimento do sistema radicular (BELINELO et al., 2008), sendo que Souza et al. (2005), além desses aspectos, avaliaram também o índice mitótico (IM) e o índice de velocidade de germinação (IVG). No sistema teste de *A. cepa*, os bulbos são colocados para enraizar em água destilada e após, deixados por 24 horas em contato direto com a substância a ser testada (LEVAN, 1938; FISKESJÖ, 1985) e avalia-se principalmente o índice mitótico e as alterações cromossômicas (KNOLL et al., 2006; LUBINI et al., 2008).

Levan (1938) foi o primeiro autor a utilizar *A. cepa* como sistema teste para detectar genotoxicidade. Foram realizadas adaptações na metodologia do teste para possibilitar uma avaliação mais abrangente de químicos, misturas complexas e substâncias puras.

Em 1985, Fiskesjö realizou as primeiras adaptações do teste para a utilização no monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas. Além disso, mostrou a importância do sistema teste de *A. cepa* para a avaliação da genotoxicidade (capacidade de substâncias causarem danos ao material genético, processo também chamado de mutagênese e os agentes que mudam a seqüência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos (SILVA et al., 2003)) de hidrocarbonetos policíclicos, pois as células de *A. cepa* apresentam sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos apesar de outros sistemas teste se mostrarem também sensíveis para esta detecção.

Os resultados do teste de *A. cepa* devem ser considerados como alerta a outros organismos (atualmente, bioindicadores) e estudos de sensibilidade e correlação entre os sistemas teste são fundamentais para avaliação mais precisa dos riscos ambientais e para extrapolação dos dados a outros grupos de organismos alvos (FISKESJÖ, 1985).

Pesquisadores compararam resultados do teste de *A. cepa* com outros sistemas teste, por exemplo, 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.

Chauan et al. (1999) indicaram a sensibilidade desse sistema e o correlacionaram com o sistema teste de mamíferos, validando sua utilização como teste alternativo para monitorar genotoxicidade, potencial de químicos ambientais e pesticidas.

Outro importante estudo foi realizado por Camparoto et al. (2002), onde utilizaram células meristemáticas de cebola e células de rato como sistemas teste para verificar os efeitos da genotoxicidade de extratos de plantas medicinais como *M. ilicifolia* e *B. candicans* e o resultado demonstrou que não houve diferença significativa na diminuição do índice mitótico em ambos os casos estudados.

Mais tarde, Teixeira et al. (2003) realizaram um estudo com a comparação entre o teste de *A. cepa*, células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos e foram observados os mesmos resultados nesses três sistemas testados.

Lubini et al. (2008) analisaram a genotoxicidade de duas espécies de *Psychotria*, *P. leiocarpa* e *P. Myriantha*, através do teste de *A. cepa* e os resultados indicaram que ambas espécies possuem capacidade para inibição da divisão celular e *P. myriantha* possui atividade genotóxica.

Conforme Alves et al. (2004) algumas plantas são capazes de sintetizar determinados metabólitos secundários, liberados no ambiente e que podem interferir no ciclo de vida de outras plantas, sendo esse processo definido como alelopatia; é como um processo pelo qual metabólitos secundários dos vegetais são liberados, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas (SOARES, 2000). Além disso, as substâncias com atividade alelopática podem vir a reduzir o uso de agrotóxicos causando menos danos ao meio ambiente (ALVES et al., 2003).

Várias espécies medicinais já foram testadas quanto a seu efeito alelopático (antiproliferativo) sobre a germinação de outras espécies, e dentre elas estão: *L. leucocephala* (leucena) (PRATES et al., 2000); *C. citratus* (capim-cidreira) e *S. rebaudiana* (estévia) (SOUZA et al., 2005); *A. minus* (bardana) (BELINELO et al., 2008); *S. lycocarpum* (fruta-do-lobo), *S. subumbellatum* (jurubebinha) e *S. granuloso-leprosum* (fumo bravo) (OLIVEIRA, 2009).

Estudos relacionados à alelopáticos, como os apresentados no parágrafo anterior, podem ser úteis no descobrimento de fitotoxinas naturais e de derivados sintéticos a serem empregados como herbicidas naturais, pois os alelopáticos podem ser mais específicos em sua ação e ainda, menos prejudiciais ao meio ambiente (SMITH e MARTIN, 1994; MACÍAS et al., 1998; CHOU, 1999).

Ainda, a alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico, que influencia o tipo de vegetação existente num ecossistema, a dominância e sucessão das plantas, a formação de comunidades, assim como o manejo e produtividade de culturas (CHOU, 1999).



**Figura 1:** Ensaio biológico com bulbos de *Allium cepa*.



**Figura 2:** Ensaio biológico com semetes de *Eruca sativa*.



## ARTIGO 1

**Evaluation of the antiproliferative, genotoxic and antimutagenic potential of the species *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton and *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae) on the *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) cell cycle**

Viviane Dal-Souto FRESCURA; Andrieli Wouters KUHN; Haywood Dail LAUGHINGHOUSE IV; Juçara Terezinha PARANHOS; Solange Bosio TEDESCO.

**Effescts of extracts of *Psychotria* L.**

**Key words:** Extracts, *Psychotria*, cells, root, *Allium cepa*.

Corresponding author: Prof. Dr. Solange Bosio Tedesco

E-mail: solatedesco@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

Species of the genus *Psychotria L.* are used in Brazilian folk medicine as tea for treating diseases of the female reproductive system, aid in pre- and post partum, bronchial disease and gastrointestinal disorders. This study aimed to evaluate the genotoxic, antiproliferative and antimutagenic potential of leaf extracts of *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton and *Psychotria birotula* Smith & Downs on the cell cycle of *Allium cepa L.* In addition, serve as an indicator of possible damages to other cell types, particularly human cells. Extracts of the leaves were prepared in the concentrations 5 and 20g.L<sup>-1</sup>, with distilled water used as negative control and glyphosate 3% as positive control. For this study, 11 groups of 5 bulbs were used, with one group of bulbs for each treatment. The slides were prepared, with 5000 cells being observed for treatment. The mitotic index (MI) was calculated and then, the statistical analysis using the Chi-Square ( $\chi^2$ ) test was performed. The infusions of *P. brachypoda* and *P. birotula* in both studied concentrations caused reduction of the MI. The extracts of *P. brachypoda* do not possess a genotoxic potential, however, *P. birotula*, possess genotoxic potential. Still, the extracts of the species do not show antimutagenic potential.

## INTRODUCTION

The economic potential of medicinal species native to Brazil is so huge that such species are considered to be a resource to be preserved and used, being of great importance the preservation of available plant genetic diversity, and to optimize the use of native medicinal resources of a country, studies on the characterization of the germplasm of these species are necessary (Pereira et al., 2006).

Rio Grande do Sul also features in its flora several species of medicinal value, such as species of the genus *Psychotria* L. Among them, one could cite *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton and *Psychotria birotula* Smith & Downs (Dillenburg and Porto, 1985).

The most frequent suggestions for the internal uses of infusions of species of the genus *Psychotria* refer to the disorders of the female reproductive, aid in pre and post partum, bronchial disease and gastrointestinal disorders. Moreover, there is also the external use, in applications such as skin disorders, tumors, ulcers, eye disorders such as poultices and baths to treat fever, headaches and earaches (Adjibadé, 1989 *apud* Paranhos, 2003; Lajis et al., 1993; Perry, 1980).

The species *P. brachypoda* produces the alkaloid psicolatine, with high pharmacological potential, because it presents analgesic activity of the opioid, anxiolytic and antipsychotic types, interacting with receptors of several neurotransmitter systems in the central nervous system (Fragoso, 2007). *P. birotula* contains alkaloids of the pyrrolodino indole type, along with meso-chimonanthine and chimonanthine, also with pharmaceutical use (Brand et al., 2009).

According to Silva et al. (2004) the consumption of tea by the population might suppress the effects of mutagenic agents, which are acting on the human organism. However, Vicentini et al. (2001) reported that the teas and herbal infusions may

contain toxic substances with mutagenic effects, and due to the heavy use of medicinal plants, toxicity and mutagenicity studies are needed to contribute to safe and effective use.

Biomarkers are useful in the studies of toxicity and mutagenicity and can be defined as indicating systems that generally include subsystems of a complete organism, used for the identification of a specific target (Silva et al., 2003). One of the plant tests most used as a bioindicator is the plant test system of *Allium cepa* L., which according to Cabrera and Rodriguez (1999) and Silva et al. (2004) is validated by the International Programme on Chemical Safety (IPCS, WHO) and the United Nations Environment Programme (UNEP) as an efficient test for the analysis and monitoring *in situ* of the genotoxicity of environmental substances, and the use of this test was introduced in science by Levan in 1938.

Studies involving the genotoxicity of medicinal plants are extremely important, being that they can alert the population about possible damage caused to the target organisms by substances that are present in the teas, as these substances are also often used in drug formulations.

Since there are no studies that report the genotoxicity of *P. brachypoda* and *P. birotula*, and the high pharmacological potential of its alkaloids, the necessity of research that may promote to the scientific knowledge of these species is needed. Thus, this study aimed to assess the antiproliferative, genotoxic, and antimutagenic potential of the leaf extracts of *P. brachypoda* and *P. birotula*, on the cell cycle of *A. cepa*. In addition, serve as an indicator of possible damages to other cell types, particularly human cells.

## MATERIALS AND METHODS

Leaves of *P. brachypoda* and *P. birotula* were collected in the municipality of Dom Pedro de Alcântara, in Rio Grande do Sul State, Brazil. The material of each specie was collected during the period of vegetative development, and properly identified and herborezed in the herbarium SMDB (Department of Biology) UFSM, under registration number 1364 (*P. birotula*) and 13165 (*P. brachypoda*).

The leaves of each species remained at room temperature for a period of 90 days. Aqueous extracts were prepared by infusion in two concentrations ( $5\text{g.L}^{-1}$  and  $20\text{g.L}^{-1}$ ) with dry leaves of *P. brachypoda* and *P. birotula*. For the preparation of aqueous extracts, leaves were infused in boiling distilled water for 10 minutes, and then strained.

The meristematic cells of the rootlets of *A. cepa* were used to evaluate the morphological and structural cells and determine the mitotic index (MI).

For this study, the following treatments were used T1- distilled water (negative control); T2- glyphosate 3% (positive control); T3- tea of *P. brachypoda*  $5\text{g.L}^{-1}$ ; T4- tea of *P. brachypoda*  $20\text{g.L}^{-1}$ ; T5- tea of *P. birotula*  $5\text{g.L}^{-1}$ ; T6- tea of *P. birotula*  $20\text{g.L}^{-1}$ ; T7- glyphosate 3% + 24 hours for possible recovery in water; T8- glyphosate 3% + 24 hours for possible recovery in tea of *P. brachypoda*  $5\text{g.L}^{-1}$ ; T9- glyphosate 3% + 24 hours for possible recovery in tea of *P. brachypoda*  $20\text{g.L}^{-1}$ ; T10- glyphosate 3% + 24 hours for possible recovery in tea of *P. birotula*  $5\text{g.L}^{-1}$ ; T11- glyphosate 3% + 24 hours for possible recovery in tea of *P. birotula*  $20\text{g.L}^{-1}$ .

Eleven groups of 5 bulbs were placed to root in distilled water, which constituted 11 treatments with 5 replicates each.

After 4 days, the negative control group (T1) was again placed in distilled water and the groups of onion bulbs of treatments T2, T3, T4, T5, and T6 were

subjected to different treatments for 24 hours, and then the roots were collected and fixed in 3:1 Carnoy (ethanol: acetic acid) during 24 hours and afterwards were stored in 70% alcohol under refrigeration. The bulb groups of treatments T7, T8, T9, T10 and T11, were subjected to 24 hours of treatment in glyphosate 3% and soon after underwent the possible recovery of the changes caused by the glyphosate. For this recovery, T7 was subjected to 24 hours in distilled water, T8 was subjected to 24 hours in extract of *P. brachypoda* 5g.L<sup>-1</sup>, T9 to 24 hours in extract of *P. brachypoda* 20g.L<sup>-1</sup>, T10 was subjected to 24 hours in extract of *P. birotula* 5g.L<sup>-1</sup>, and T11 to 24 hours in extract of *P. birotula* 20g.L<sup>-1</sup>. After this recovery period, the roots were collected and fixed in 3:1 fixative (ethanol: acetic acid) for 24 hours and afterwards stored in 70% alcohol under refrigeration.

To analyze cell division of the roots of onion bulbs rooted in water and subjected to different treatments, rootlets of approximately 2 cm were collected, which were hydrolyzed in HCl 1N for 5 minutes, using only the meristematic region, and after were stained with acetic orcein 2%, following with the meristematic region being squashed using a glass rod and the material was placed on a coverslip (Guerra and Souza, 2002). The slides were observed and analyzed with a light microscope LEICA 400X. The total count was made of cells in division, occurrence of chromosomal alterations and the MI was calculated, obtained by dividing the number of dividing cells by the total number of cells observed and multiplying by 100.

Per bulb, 1000 cells were counted, where two slides were prepared, counting 500 cells per slide, with a total of 5000 cells per group of bulbs for each treatment.

The statistical analysis, for comparison between the values of the MI and the rates of cellular changes was performed using the Chi-square ( $\chi^2$ ) test, with the aid of the program BIOESTAT 5.0 (Ayres, 2007).

## RESULTS

In Table 1, the number of cells observed in interphase and in the different phases of cell division during the *A. cepa* cell cycle are observed, as well as the MI.

While comparing the MI of the positive control (MI= 3.54%) with the negative control (MI= 5.32%) a significant difference is observed between them ( $\chi^2=18.709$ ).

For the species *P. brachypoda*, there was a significant inhibition in cell division in both concentrations in relation to the negative control (extract at the concentration of  $5\text{g.L}^{-1}$  with  $\chi^2= 141.513$  and at the concentration of  $20\text{g.L}^{-1}$  with  $\chi^2= 228.063$ ). These treatments also differed from the positive control with  $\chi^2= 64,336$  for the concentration of  $5\text{g.L}^{-1}$  (MI= 1.12%) and  $\chi^2= 136.949$  for the concentration of  $20\text{g.L}^{-1}$  (MI= 0.32%). There is a significant difference when comparing the two concentrations of the extracts of *P. brachypoda*, with  $\chi^2= 22.383$ .

The extract of *P. brachypoda* in lowest concentration (T3) did not differ from T5 ( $\chi^2= 3.972$ ) and differed from T6 ( $\chi^2= 61.178$ ), T7 ( $\chi^2= 73.196$ ), T8 ( $\chi^2= 88.188$ ), T9 ( $\chi^2= 78.129$ ), T10 ( $\chi^2= 83.927$ ), and T11 ( $\chi^2= 105.456$ ).

The extract at the concentration of  $20\text{g.L}^{-1}$  of *P. brachypoda* (T4), differed from T5 ( $\chi^2=42.180$ ), T6 ( $\chi^2= 132.930$ ), T7 ( $\chi^2= 148.040$ ), T8 ( $\chi^2=166.305$ ), T9 ( $\chi^2=154.113$ ), T10 ( $\chi^2= 161.217$ ), and T11 ( $\chi^2= 186.751$ ).

The species *P. birotula* also presented a significant reduction of the MI values for the studied concentrations compared to the negative control ( $\chi^2=104.981$  for the extract at  $5\text{g.L}^{-1}$  with MI= 1.58 and  $\chi^2= 20.606$  for the extract at  $20\text{g.L}^{-1}$  with MI= 3.86). There was a significant reduction of the MI in both concentrations, and the extracts differed significantly between each other, with  $\chi^2= 35.970$ .

The extracts of *P. birotula* were also compared with the positive control. In this comparison the extract in smallest concentration ( $5\text{g.L}^{-1}$ ) differed significantly

( $\chi^2= 38.501$ ) and the extract in the highest concentration ( $20\text{g.L}^{-1}$ ) did not present a significant difference ( $\chi^2= 0.047$ ).

The treatment with the concentration of  $5\text{g.L}^{-1}$  *P. birotula* also differed from T7 ( $\chi^2= 45.719$ ), T8 ( $\chi^2= 58.253$ ), T9 ( $\chi^2= 49.803$ ), T10 ( $\chi^2= 54.688$ ), and T11 ( $\chi^2= 73.078$ ), and contrarily, the treatments with the concentrations of  $20\text{g.L}^{-1}$  did not differ from the treatments T7 ( $\chi^2= 0.647$ ), T8 ( $\chi^2= 2.987$ ), T9 ( $\chi^2= 1.247$ ), T10 ( $\chi^2= 2.178$ ), and T11 ( $\chi^2= 7.333$ ).

Treatments T7, T8, T9, T10, and T11 did not differ from the positive control ( $\chi^2= 0.344$ ,  $\chi^2= 2.283$ ,  $\chi^2= 0.0809$ ,  $\chi^2= 1.584$ , and  $\chi^2= 6.208$  respectively), and also did not differ from the negative control with the respective values:  $\chi^2= 14.038$ ,  $\chi^2= 8.005$ ,  $\chi^2= 11.813$ ,  $\chi^2= 9.490$ , and  $\chi^2= 3.420$ .

Treatments T7, T8, T9, T10, and T11 did not differ between each other, being that the values for  $\chi^2$  were: T7XT8= 0.856, T7XT9= 0.098, T7XT10= 0.452, T7XT11= 3.639, T8XT9= 0.375, T8XT10= 0.064, T8XT11= 0.968, T9XT10= 0.129, T9XT11= 2.545, and T10XT11= 1.529.

In Table 2, the number of cells with chromosomal alterations is presented and the types of alterations that occurred in each of the treatments.

The alterations observed in each of the treatments were bridges in anaphase (Figures 1B and 1C) and telophase (Figure 1D), chromosomal breakage (Figura 1E), and laggard chromosomes (Figure 1A).

There was a significant difference in the comparison of the values of chromosomal alterations between the negative control, without alterations, and the positive control with 102 alterations ( $\chi^2= 100.980$ ).

The aqueous extracts of *P. brachypoda* in both concentrations had their values for the alterations compared with the negative control and the result for the



concentration of 5 g.L<sup>-1</sup> (7 alterations) was of  $\chi^2=0.0082$  and for the concentration of 20g.L<sup>-1</sup> (4 alterations) was  $\chi^2= 3.998$ , and there was no statistically difference in any case not even comparing the treatments between each other ( $\chi^2= 0.817$ ).

Compared with the positive control, the extracts of *P. brachypoda* in the lowest ( $\chi^2= 81.913$ ) and highest concentration  $\chi^2= 89.662$ , differed significantly.

The treatments with the extracts in both concentrations (T3 and T4) of *P. brachypoda* differed from the treatments T5 (T3XT5:  $\chi^2= 17.708$ ; T4XT5:  $\chi^2= 23.595$ ), T6 (T3XT6:  $\chi^2= 57.850$ ; T4XT6:  $\chi^2= 65,265$ ), T7 (T3XT7:  $\chi^2= 23.969$ ; T4XT7:  $\chi^2= 30.286$ ), T8 (T3XT8:  $\chi^2= 48.293$ ; T4XT8:  $\chi^2= 55.509$ ), T9 (T3XT9:  $\chi^2= 35.057$ ; T4XT9:  $\chi^2= 41.885$ ), T10 (T3XT10:  $\chi^2= 33.187$ ; T4XT10:  $\chi^2= 39.945$ ), and T11 (T3XT11:  $\chi^2= 48.293$ ; T4XT11:  $\chi^2= 55.509$ ).

The concentrations of the extracts of the species *P. birotula* differed from the negative control ( $\chi^2= 33.885$  for the extract at 5g.L<sup>-1</sup> with 34 alterations and  $\chi^2= 76.416$  for the concentration of 20g.L<sup>-1</sup> with 77 alterations), and in comparison with the positive control the results were  $\chi^2=38.501$  for the least concentration, presenting a significant difference and  $\chi^2=0.047$  for the highest concentration without differing significantly.

Both concentration of the extracts of *P. birotula* differed from each other with  $\chi^2= 16.475$ , indicating a higher genotoxic potential for the concentration at 20g.L<sup>-1</sup> with 77 alterations, where the concentration of 5g.L<sup>-1</sup> presented 34 alterations (Table 2).

The treatments with the extracts of *P. birotula* (T5 and T6) did not differ from the treatments T7 (T5XT7:  $\chi^2= 0.648$ ; T6XT7:  $\chi^2= 10.855$ ), T8 (T5XT8:  $\chi^2= 10.674$ ; T6XT8:  $\chi^2= 0.685$ ), T9 (T5XT9:  $\chi^2= 4.114$ ; T6XT9:  $\chi^2= 4.374$ ), T10 (T5XT10:  $\chi^2= 3.371$ ; T6XT10:  $\chi^2= 5.215$ ), and T11 (T5XT11:  $\chi^2= 10.674$ ; T6XT11:  $\chi^2= 0.685$ ).

In this study, we also evaluated the antimutagenic effect of the extracts of *P. brachypoda* and *P. birotula*. For this evaluation, the chromosomal alterations observed in the positive control (glyphosate 3%) and in the negative control were analyzed, and this value was compared with the values of the alterations observed in the treatments T7, T8, T9, T10, and T11, where the bulbs were treated 24 hours with glyphosate 3% and posteriorly treated with distilled water in T7, *P. umbellata* extract 5g.L<sup>-1</sup> in T8, *P. brachypoda* extract 20g.L<sup>-1</sup> in T9, *P. birotula* extract 5g.L<sup>-1</sup> in T10, and *P. birotula* extract 20g.L<sup>-1</sup> in T11.

Treatments T7 (41 alterations), T8 (67 alterations), T9 (53 alterations), T10 (51 alterations), and T11 (67 alterations) differed from the negative control (T1) with the following values for  $\chi^2$ : T1XT7= 40.833; T1XT8= 66.557; T1XT9= 52.722; T1XT10= 50.753; T1XT11= 66.557.

Treatments T7, T9, and T10 differed, in regards to alterations, from the positive control (T2) with  $\chi^2$ : T2XT7= 25.655; T2 X T9= 15.254; and T2 X T10= 16.744. Now treatments T8 and T11 did not present a significant difference from the positive control,  $\chi^2= 7.128$  for T8 and  $\chi^2= 7.128$  for T10.

There was not a difference in the number of alterations in the treatments used to evaluate the antimutagenic effects (T7XT8:  $\chi^2= 6.192$ ; T7XT9:  $\chi^2= 1.518$ ; T7XT10:  $\chi^2= 1.077$ ; T7XT11:  $\chi^2= 6.192$ ; T8XT9:  $\chi^2= 1.614$ ; T8XT10:  $\chi^2= 2.144$ ; T8XT11:  $\chi^2= 0.000$ ; T9XT10:  $\chi^2= 0.038$ ; T9XT11:  $\chi^2= 1.614$ ; T10XT11:  $\chi^2= 2.144$ ).

The treatments used for the study of the antimutagenic potential in which the *A. cepa* bulbs were submitted to the treatment with glyphosate 3% (mutagenic) and after 24hrs, passed through a treatment with the extracts of *P. brachypoda* presented an expressive number of cells in apoptosis (Figure 1F), both at the concentration of 5

g.L<sup>-1</sup> and 20g.L<sup>-1</sup> (T8 and T9 respectively) and the number of cells in apoptosis is larger in the treatment with the concentration of 20g.L<sup>-1</sup>.

## DISCUSSION

The positive control in this study was glyphosate, since it has been proven to induce chromosomal alterations in meristematic cells of *A. cepa* (Souza et al., 2010). In this study, glyphosate 3% inhibited the cell division and caused significant chromosomal alterations, when compared with the negative control, indicating that at the concentration of 3%, glyphosate is antiproliferative and genotoxic.

The extracts of *P. brachypoda* in the concentrations of 5g.L<sup>-1</sup> and 20g.L<sup>-1</sup> inhibited cell division, since the MI of these treatments differed significantly from the MI of the negative and positive controls. Thus, the aqueous extracts of *P. brachypoda* at the studied concentrations presented antiproliferative potential and this potential is higher with an increase in concentration. The same result was obtained in the study by Lubini et.al (2008), where *P. myriantha* and *P. leiocarpa* presented antiproliferative potential whose potential was also dose-dependent.

Other species were tested in different concentrations with the *A. cepa* test and the highest concentration inhibited cell division, for example: Teixeira et al. (2003) analyzed the medicinal species *Psidium guajava L.* and *Achillea millefolium L.* and in both species, the highest concentration had the highest antiproliferative potential; Knoll et al. (2006) studied the genotoxic potential of different populations of the medicinal species *Pterocaulum polystachyum DC.* and the results indicated that the antiproliferative potential was dose-dependent; Fachinnetto et al. (2007) reported that *Achyrocline satureioides (Lam.) DC.* presented antiproliferative activity on the *A. cepa* cell cycle and this action was dose-dependent; Bagatini et. al (2009) tested

extracts of *Solidago microglossa* DC. at concentrations of  $1.75\text{g.L}^{-1}$  and  $14\text{g.L}^{-1}$  and the higher concentration presented a reduction in the MI when compared to the controls; the species *Baccharis trimera* (Less.) DC. and *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. were also studied with the *A. cepa* test by Fachinetto and Tedesco (2009), whom evaluated extracts from two populations in two concentrations, and the results indicated an antiproliferative potential in the highest concentration for both species; Jorge et al. (2009) reported an antiproliferative effect in the highest concentration for the medicinal species *Thuja occidentalis* L. and, Dalla Nora et al. (2010) reported an antiproliferative potential in the highest concentration for the medicinal species *Mikania glomerata* Spreng.

According to Fachinetto et al. (2007), it is possible that the high concentration of some chemical compounds have an effect (inhibit or stimulate) on the cell cycle and the extracts of *P. birotula* at the concentrations of  $5\text{g.L}^{-1}$  and  $20\text{g.L}^{-1}$  inhibited cell division, however, the antiproliferative potential was higher in the lower concentration ( $5\text{g.L}^{-1}$ ), contrary to the extracts of *P. brachypoda*, this study, and of other species of the genus, such as *P. myriantha* and *P. leiocarpa* studied by Lubini et al. (2008), which showed a higher antiproliferative potential with an increase in the concentration of the extracts.

In the treatments with the extracts of the medicinal species *P. brachypoda* at different concentrations, chromosomal alterations occurred, however the number of alterations was not significant, thus, extracts of *P. brachypoda* do not possess genotoxic potential. On the other hand, extracts of *P. birotula*, by the significant number of alterations possess a genotoxic potential on the meristematic cells of *A. cepa*. These same results were observed in the species *P. leiocarpa* and *P. myriantha*, where the extract from the species *P. leiocarpa* did not present a

genotoxic potential and the extracts of *P. myriantha* demonstrated a genotoxic potential on the *A. cepa* cell cycle (Lubini et al., 2008).

The leaf extracts of the species *P. brachypoda* in the highest concentration ( $20\text{g.L}^{-1}$ ) and of *P. birotula* in the lowest concentration ( $5\text{g.L}^{-1}$ ) can significantly reduce chromosomal alteration when used after glyphosate 3%. However, the extract of *P. brachypoda* at the concentration of  $5\text{g.L}^{-1}$  and the extract of *P. birotula* at  $20\text{g.L}^{-1}$  did not significantly reduce the chromosomal alterations resultant of the treatment with glyphosate 3%.

Therefore, we expected that after treating the onion bulbs that had been previously placed in glyphosate 3% with extracts prepared by infusing both species of *Psychotria*, would show a significant difference (a 'recovery') in relation to those submitted to water, and this did not happen. Despite the recovery in the extracts of *Psychotria* reducing the number of chromosomal alteration, we did not observe antimutagenic potential in the species.

Extracts of the medicinal species *Aloe vera* Inhibited the mutations in cells of *A. cepa* when used 24hrs after the treatment with paracetamol (Sturbelle et al., 2010). Furthermore, the medicinal species *P. guajava* and *A millefolium* also presented antimutagenic potential (Teixeira et al., 2003).

*A. cepa* cells submitted to the treatments with glyphosate 3% (mutagenic) during 24hrs and afterwards, passing through a treatment with extracts of *P. brachypoda* presented an expressive number of cells in apoptosis in both concentrations and there was an increase in the percentage of cells in apoptosis with an increase in the concentration of extracts of *P. brachypoda*, agreeing with Cardoso et al. (2006) where they stated that there is a relation with the number of cells in apoptosis and the quantity of chemical substances present in the infusion.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and Prof. Fernando Teixeira Nicoloso and Prof<sup>a</sup> Thais Scott do Canto Dorow.

## REFERENCES

Ayres M (2007). BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. Ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq.

Bagatini MD, Fachinetto JM, Silva ACF, Tedesco, SB (2009) .Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**: 632-636.

Brand G, Ricardo LL, Stain SMO, Henriques AT, Sarragiotto MH (2009). Alcalóides pirrolidino-indolínicos de *Psychotria birotula*. XVII Encontro de Química da Região Sul.

Cabrera G L, Rodriguez DMG (1999), Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research* **426**: 211-214

Cardoso CRP, Cólus IMS, Bernardi CC, Sannomiya M, Vilegas W, Varanda EA (2006). Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* **225**: 55-63.

Dalla Nora G, Pastori T, Laughinghouse IV HD, Canto-Dorow TS, Tedesco SB (2010). Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell* **34**: 85-101.

Dillenburg CR, Porto ML (1985). Rubiaceae: Tribo *Psychotrie*. Porto Alegre, Boletim Instituto de Biociências da UFRGS.

Fachinetto JM, Tedesco SB (2009). Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **11**: 360-367.

Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB (2007). Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**: 49-54.

Fragoso V (2007). Alcalóides de *Psychotria*: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

Guerra M, Souza MJ (2002). Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec.

Jorge VR, Prandini EV, Karsburg IV (2009). Citotoxicidade de *Allium cepa* em diferentes concentrações de Tuia (*Thuja Occidentalis*). 2ª Jornada Científica da Unemat.

Knoll MF, Silva ACF, CantoDorow TS, Tedesco SB (2006). Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genetics and Molecular Biology* **29**: 539-542.

Lajis NH, Mahmud Z, Toia RF (1993). The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Médica* **59**: 383-384.

Levan A (1938). The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* **24**: 471-486.

Lubini G, Fachinetto JM, Laughinghouse IV HD, Paranhos, JT, Silva ACF, Tedesco SB (2008). Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia* **63**: 647-651.

Paranhos JT (2003). Produção de alcalóides bioativos em *Psychotria umbellata* Vell. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht. Tese do Programa de Pós-Graduação em. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pereira LP, Luz P, Tedesco SB, Silva ACF (2006). Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* **36**: 678-681.

Perry LM (1980). Rubiaceae. In: Medicinal plants of east and southeast. Cambridge, MIT Press.

Silva CR, Monteiro MR, Caldeira-de-Araújo A, Bezerra RJAC (2004). Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **14**: 1-3.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (2003). Genética toxicológica. Porto Alegre, Alcanace.



Smith AE, Martin DL (1994). Allelopathic characteristics of three cool-season grass in the forage ecosystems. *Agronomy Journal* **8**: 243-246.

Souza LF, IV Laughinghouse HD, Pastori P, Tedesco MT, Kuhn AW, Canto-Dorow TS, Tedesco SB (2010). Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. *International Journal of Environmental Studies* **67**: 871-877.

Sturbelle RT, Pinho DS, Restani RG, Oliveira GR, Garcias GL, Martino-Roth MG (2010). Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Revista brasileira de farmacognosia* **20**: 409-415.

Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 551-555.

Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS (2001). *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. *Acta Scientiarum* **23**: 593-598.

**TABLE 1:** Number of cells in interphase, mitosis, and the mitotic index of the *Allium cepa* root-tips for each treatment.

Treatment	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	MI (%)
T1: Distilled Water*	4734	154	42	29	41	5.32 <sup>a</sup>
T2: Glyphosate 3% **	4823	48	79	30	20	3.54 <sup>b</sup>
T3: Leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	4944	16	7	13	20	1.12 <sup>c</sup>
T4: Leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	4984	10	0	3	3	0.32 <sup>d</sup>
T5: Leaf extracts of <i>P. birotula</i> 5g.L <sup>-1</sup>	4921	37	15	12	15	1.58 <sup>c</sup>
T6: Leaf extracts of <i>P. birotula</i> 20g.L <sup>-1</sup>	4827	85	57	16	35	3.86 <sup>b</sup>
T7: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in distilled water	4812	66	49	36	37	3.76 <sup>ab</sup>
T8: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	4794	69	58	42	37	4.12 <sup>ab</sup>
T9: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	4806	61	47	37	49	3.88 <sup>ab</sup>
T10: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. birotula</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	4799	68	28	31	74	4.02 <sup>ab</sup>
T11: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. birotula</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	4774	71	45	28	82	4.52 <sup>ab</sup>

Means followed by the same letter do not differ significantly at the 5% level, by the  $\chi^2$ .

\* Negative control

\*\* Positive control

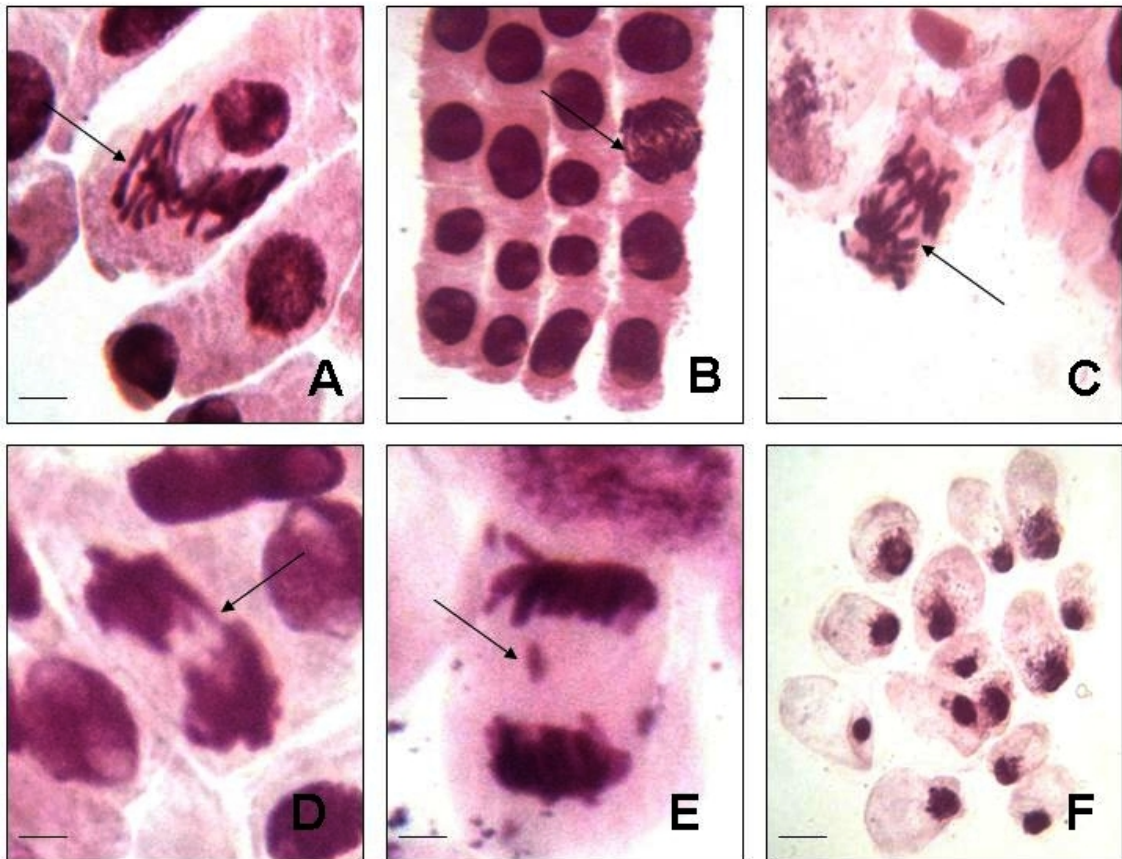
**TABLE 2:** Number of cells with chromosomal alterations the types of alterations that occurred in each of the treatments.

Treatment	Bridges in anaphase and telophase	Chromosomal breakage	Laggard Chromosome	Cell total with alterations
T1: Distilled Water*	0	0	0	0 <sup>a</sup>
T2: Glyphosate 3% **	22	40	40	102 <sup>c</sup>
T3: Leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	02	0	05	07 <sup>a</sup>
T4: Leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	01	0	03	04 <sup>a</sup>
T5: Leaf extracts of <i>P. birotula</i> 5g.L <sup>-1</sup>	11	0	23	34 <sup>b</sup>
T6: Leaf extracts of <i>P. birotula</i> 20g.L <sup>-1</sup>	30	0	47	77 <sup>b,c</sup>
T7: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in distilled water	07	16	18	41 <sup>b</sup>
T8: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	37	09	21	67 <sup>b,c</sup>
T9: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	43	0	10	53 <sup>b</sup>
T10: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. birotula</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	31	02	18	51 <sup>b</sup>
T11: Glyphosate 3% + 24 hrs for recovery in leaf extracts of <i>P. birotula</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	37	0	30	67 <sup>b,c</sup>

Means followed by the same letter do not differ significantly at the 5% level, by the  $\chi^2$ .

\* Negative control

\*\* Positive control



**FIGURE 1:** Cells of *Allium cepa* submitted to the distinct treatments. **A)** Cell in metaphase with laggard chromosome submitted to the treatment with leaf extract of *Psychotria birotula* 5g.L<sup>-1</sup>; **B)** Cell with anaphasic bridges submitted to the treatment with *P. birotula* 20g.L<sup>-1</sup>; **C)** Cell with anaphasic bridges submitted to the leaf extract of *P. brachypoda* 5g.L<sup>-1</sup>; **D)** Cell with telophasic bridges submitted to the treatment with glyphosate 3% **E)** Cells in telophase with chromosomal breakage submitted to the treatment of glyphosate 3% + 24hrs recovery in leaf extract of *P. birotula* 5g.L<sup>-1</sup>; **F)** Cells in apoptosis submitted to the treatment of glyphosate 3% + 24hrs recovery in leaf extract of *P. brachypoda* 20g.L<sup>-1</sup>. Scale 10  $\mu$ m.

## ARTIGO 2

### **Evaluation of the antiproliferative and genotoxic potential of the species *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton and *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae) on the germination and cell cycle of *Eruca sativa* Mill. (Brassicaceae)**

Viviane Dal-Souto Frescura<sup>(1)</sup>; Andrielle Wouters Kuhn<sup>(2)</sup>; Haywood Dail Laughinghouse IV<sup>(3)</sup>; Fernando Teixeira Nicoloso<sup>(4)</sup>; Sidnei José Lopes<sup>(4)</sup>; Solange Bosio Tedesco<sup>(4)</sup>.

- 1- Graduate Program in Agrobiology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil;
- 2- Undergraduate Program in Biology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil;
- 3- Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA;
- 4- Department of Biology, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil;

E-mail: solatedesco@yahoo.com.br. \*Corresponding author.

#### **ABSTRACT**

Biological assays are widely used to monitor toxic and allelopathic substances. The present study aimed to evaluate the antiproliferative and genotoxic potential of the leaf extracts of *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton and *Psychotria birotula* Smith & Downs in two concentrations on the germination and cell division of *Eruca sativa* Mill. seeds. The collection of botanical material (leaves) occurred in the municipality of Dom Pedro de Alcântara/RS. Infusions of the leaves were prepared in two concentrations for each species: 5g.L<sup>-1</sup> and 20g.L<sup>-1</sup>, with distilled water used as negative control and glyphosate 3% as positive control. The assay was conducted in a controlled growth chamber. For monitoring the antiproliferative on the germination (allelopathic potential), the following variables were evaluated: total number of germinated seeds, seedling root length, germination velocity index, and percentage

of germination. The means were compared using the Tukey test and orthogonal contrasts were undertaken to better compare the variables. To evaluate the antiproliferative and genotoxic potential, seedling roots were collected and the squashing technique was followed for preparation of slides, mitotic index (MI) and means was calculated and then, the statistical analysis using the Chi-Square ( $\chi^2$ ) test was performed. The results demonstrated that the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* inhibited the development in seeds of arugula, in addition to inhibiting cell division and inducing chromosomal alterations in *Eruca sativa*. We conclude that the studied species have antiproliferative on the germination and cell cycle, and genotoxic potential on *Eruca sativa* in both concentrations studied.

Key-words: Biological assays; *Psychotria brachypoda*; *Psychotria birotula*, *Eruca sativa*.

## INTRODUCTION

Brazil has a large diversity of plant species used in popular medicine due to the production of medicinal substances, which according to Martins et al. (2000) are most often the result of plant secondary metabolism. Besides this, the substances produced by the plant can positively or negatively (antiproliferative) affect other plant species, known as allelopathy, and the substances responsible for this effect, allelochemicals (Carvalho, 1993).

These compounds participate in the allelopathic activity and are present in all the plant's tissue, including leaves, flowers, fruits, roots, rhizomes, stems, and seeds (Gatti et al., 2004). It is considered that all plant organs have the potential to store allelochemicals, but the quantity and path by which they are emitted differs from species to species (Friedman, 1995).

Currently, allelopathy has been recognized as an important ecological mechanism that influences the type of existing vegetation in an ecosystem, the dominance and succession of plants, the formation of communities, as well as crop management and productivity (Chou, 1986; 1999).

For studies that verify the allelopathic effects of extracts, plants species are used, such as *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (sorghum), *Cucumis sativus* L. (cucumber) (Belinelo et al., 2008), *Lactuca sativa* L. (lettuce), *Eruca sativa* Mill. (arugula) (Souza et al., 2005), and *Sesamum indicum* L. (sesame) (Oliveira, 2009).

Biological assays for verifying allelopathy can be carried out on filter paper, inert substrate, hydroponics or soil (Weidenhamer et al. 1989) and the evaluated parameters are typically germination and root length (Belinelo et al., 2008). Besides germination, Souza et al. (2005) evaluated mitotic index (MI) and the germination velocity index (GVI).

Many medicinal species have been tested for their antiproliferative potential on the germination (allelopaty), among them are *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt (Prates et al., 2000); *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Stevia rebaudiana* (Bert.) (Souza et al., 2005); *Arctium minus* (Hill.) Bernh. (Belinelo et al., 2008); *Solanum lycocarpum* A. St. Hil., *Solanum subumbellatum* Vell., *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (Oliveira, 2009), *Ruta graveolens* L. (De Feo et al., 2002), *Salvia*

*officinalis* L. (Viecelli and Cruz-Silva, 2009), *Vernonia tweediana* Baker (Olguin et al., 2005).

The evaluation of the allelopathic, antiproliferative, and genotoxic potential can assist in finding new substances which can be used as natural herbicides. These herbicides, being natural, would be less aggressive on the environment.

The antiproliferative effect can inform the capacity that a substance has to inhibit the proliferation of cancerogenous cells in addition to its genotoxic effects. The target organisms can be used to verify the genotoxic effects and serve to alert the population about possible and eventual damages caused. Substances found in teas are many times used in pharmaceutical formulas.

Among the species of the genus *Psychotria*, the species *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton produces the alkaloid psycholatine, which contains a high pharmacological potential due to analgesic activity of the opioid, anxiolytic, and antipsychotic types, interacting with receptors of several neurotransmitter systems in the central nervous system (Fragoso, 2007). Furthermore, the species *Psychotria birotula* Smith & Downs produces pyrrolidino indole alkaloids meso-chimonanthine and chimonanthine, also with pharmacological use (Brand et al., 2009).

The present study aimed to evaluate the antiproliferative and genotoxic potential of the leaf extracts of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* in two concentrations on the germination and cell cycle of *Eruca sativa* seeds.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling of plant material**

Leaves of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* were collected in the municipality of Dom Pedro de Alcântara, in Rio Grande do Sul State, Brazil. The material of each specie was collected during the period of vegetative development, properly identified and herborezed in the herbarium SMDB (Department of Biology) UFSM, under registration number 1364 and 13165, respectively.



### **Extract preparation**

After sampling, the leaves were allowed to dry at room temperature for 90 days, for latter preparation of extracts.

Aqueous extracts were prepared by infusion in two concentrations ( $5\text{g.L}^{-1}$  and  $20\text{g.L}^{-1}$ ) with dry leaves of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula*. Para isso preparation of aqueous extracts, leaves were infused in boiling distilled water for 10 minutes, and then strained.

### **Biological assay**

At this stage, for testing germination inhibition, rootlet growth, and analysis of the cell division, seeds of *Eruca sativa* were used as test-organisms. Seeds of *Eruca sativa* were distributed in 9 cm Petri dishes, lined with 3 sheets of filter soaked with 7 ml of each treatment and placed into plastic bags to prevent evaporation of the treatments. The treatments used were: T1= distilled water, T2= glyphosate 3%, T3= *Psychotria brachypoda* extract  $5\text{g.L}^{-1}$ , T4= *Psychotria brachypoda* extract  $20\text{g.L}^{-1}$ , T5= *Psychotria birotula* extract  $5\text{g.L}^{-1}$ , and T6= *Psychotria birotula* extract  $20\text{g.L}^{-1}$ .

After soaked, the plates remained in a growth chamber for 72 hours at  $25^{\circ}\text{C}$  and LD 16:8 photoperiod. Five replicates were used for each treatment, where each replicate contained 50 seeds evaluated, in a completely randomized design.

Counts were carried out daily to calculate the Germination Velocity Index (GVI) and compare the means of germinated seeds each 24 hours. For the calculation of germination inhibition, the count of the total number of seeds germinated at the end of 72 hrs was undertaken, followed by measuring their roots.

### **Mitotic Index (MI)**

After 72 hours of germination, the roots were collected and fixed in Carnoy (3:1; ethanol: acetic acid) for 24 hrs at room temperature, then placed in 70% alcohol under refrigeration.

The squashing technique was used for slide preparation where the roots of *Eruca sativa* were placed in HCl 1N to hydrolyze for 5 min. Afterwards, the meristematic region was stained with acetic orcein 2%, squashed with a glass rod over a coverslip (Guerra and Souza, 2002). The slides were observed and analyzed using a LEICA microscope at 400x. A count was undertaken of all cells in division,

analyzed the occurrence of chromosomal alterations, and the mitotic index (MI) was calculated.

Two slides per replicate were studied, with 500 cells per slide and a total of 5000 cells per treatment. The MI was obtained by dividing the number of cells in division by the total number of cells and multiplying by 100.

### **Statistical analysis**

The experimental design was completely randomized with six treatments and five replicates (each Petri dish was considered one replicate), and each replicate contained 50 seeds of *Eruca sativa*.

The means of the root lengths, the germination percentage, germination velocity index (GVI), and the mean of the seeds germinated each 24 hrs were considered.

The data were tested for normality and transformed using the formula  $\arcsin \sqrt{x/100}$ . The chi-square ( $\chi^2$ ) test was used for comparisons between the mitotic indices and the chromosomal alterations, using the program Bioestat 5.0 (Ayres, 2007). The other data were submitted to ANOVA and compared with the Tukey test (5% prob.) with the program Assistat version 7.6 Beta. The means of the germinated seeds in each treatment each 24 hrs were compared by orthogonal contrasts.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In this study the potential of the aqueous extracts of the species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula*, in two concentrations, on the seed germination and cell division of *Eruca sativa* were studied.

In Table 1 and Figure 1, the mean root length, GVI, and the percentage of germination in all treatments is presented. For the variable root length, all the treatments differed significantly from the negative control, including the positive control in glyphosate 3%, which was expected to decrease the root length of *Eruca sativa*.

The aqueous extracts of leaves of *Psychotria brachypoda* and of *Psychotria birotula* interfered in the root development of *Eruca sativa*, with a higher inhibitory

potential for the extracts of *Psychotria brachypoda*, and with an increasing concentration this potential was more damaging. For the species *Psychotria birotula*, the potential did not vary between the concentrations. Both species, *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* inhibited root growth in *Eruca sativa* (Table 1 and Figure 1).

These results coinciding with the results observed by Stein et al. (2008) where the medicinal species *Plantago australis* Lam. and *Plantago brasiliensis* Sims. reduced the development of lettuce leaves. The essential oil of leaves of passion fruit also decreased the length of lettuce, tomato, and melissa roots (Rosado et al., 2005). The extracts of *Bidens pilosa* L. and *Bidens alba* (L.) DC inhibited the root growth of *Lactuca sativa* (Lima et al., 2011) and the leaf extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi inhibited the root growth of *Brachiaria decumbens* (Forsski) Stapf. (Pessanha et al., 2010).

*Bidens pilosa* and *Lactuca sativa* had their root and shoot growth affected by the extracts of *Plectranthus barbatus* Andrews (Azambuja et al., 2010), while the extracts of *Leucaena leucocephala* inhibited the root development of *Zea mays* L. (Prates et al., 2000; Pires et al., 2001).

The IVG was not affected by the extract of *Psychotria brachypoda* at 5g.L<sup>-1</sup>, however at 20g.L<sup>-1</sup> there was a negative effect on the IVG of the *Eruca sativa* seeds, while the extracts of *Psychotria birotula* at both 5 g.L<sup>-1</sup> and 20g.L<sup>-1</sup> did not inhibit the the IVG of *Eruca sativa*. *Psychotria brachypoda* does not reach the IVG in low concentrations and *Psychotria birotula* does not present inhibitory effects at 5 and 20g/L (Table 1 and Figure 1).

The germination percentage was significantly affected only by the extract of *Psychotria brachypoda* at the concentration of 20g/L and the extracts of *Psychotria birotula* in both concentrations did not inhibit germination. There was not a significant difference between the concentrations evaluated (Table 1 and Figure 1).

Results of GVI inhibition and germination percentage were also observed by Mairesse et al. (2007) who observed reduction in the percentage of germination of lettuce seeds with the use of extracts of *Amaranthus cruentus* L. (amaranth), *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (murta), *Casearia sylvestris* Sw. (crackopen), and *Grevillea banksii* R. Br. (kahiliflower). Borella and Pastorini (2009) reported that extracts of *Phytolacca dioica* L. also affect the percentage of

germination, GVI, root length, shoot growth, fresh and dry weight, and this effect was enhanced with the increasing concentration of extracts.

The use of the ethanolic extract of *Eucalyptus citriodora* Hook. reduced the velocity of germination of *Bidens pilosa* (Ferreira et al., 2007). Also, the increase in the concentration of leaf extracts of *Schinus terebinthifolius* inhibited the GVI of *Brachiaria decumbens* (Pessanha et al., 2010), and the extracts of *Plectranthus barbatus* reduced the GVI of seeds of *Bidens pilosa* and *Lactuca sativa* (Azambuja et al., 2010). The extracts of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Stevia rebaudiana* Bertoni reduced GVI in seeds of *Eruca sativa* and *Lactuca sativa* and the inhibitory effect was more pronounced with increasing concentration of extracts (Souza et al., 2005).

Table 2 present the values of the orthogonal contrasts, showing the differences between treatments to which were applied extracts of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* at the different concentrations and the negative and positive controls. All the treatments differed from one another, indicating that the extracts possess an allelopathic effect.

According to the contrasts there was an interaction between the six treatments and the three observation times, in other words, every 24 hours the behavior of each treatment changed (Table 2).

By the orthogonal contrasts, there was not a difference between the species in study, however, there was a difference between concentrations both for *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula*, where an increase in the concentration caused an increase in the allelopathic potential (Table 2).

In Table 3 the results for the phases of cell division of the analyzed cells are presented as well as the mitotic index of each treatment. In this table it is possible to observe that all the treatments differ from the negative control – distilled water (T1) and the values for  $\chi^2$  are presented in Table 5. Glyphosate 3% was used as a positive control (T2) and was only significantly different from the negative control (T1), demonstrating that the extracts of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* possess antiproliferative potential (Table 3).

The treatments with the extract of *Psychotria brachypoda* at the concentrations of 5 g.L<sup>-1</sup> and 20 g.L<sup>-1</sup> did not differ between each other and the same occurred for the extracts of *Psychotria birotula* in both concentrations, where

there was also not a difference between the extracts of the two species in study (Table 3). The comparison between the numbers of chromosomal alterations demonstrated that the only significant difference was between the positive and negative control (Table 4).

In the comparison between the treatments with the extracts of the species in study, there was not a difference and none of these treatments differed from the positive control. Like glyphosate 3%, the extracts from *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* at 5 and 20g.L<sup>-1</sup> showed genotoxic potential on the cell cycle of *Eruca sativa* (Table 4).

In the treatment with distilled water (T1= negative control), no chromosomal alterations occurred while the treatment with glyphosate 3% (T2= positive control) had 25 chromosomal alterations. The other treatments presented the following number of chromosomal alterations: extract of *Psychotria brachypoda* at 5 g.L<sup>-1</sup>= 11 alterations, extract of *Psychotria brachypoda* 20g.L<sup>-1</sup>= 6 alterations, extract of *Psychotria birotula* 5g.L<sup>-1</sup>= 5 alterations, and extract of *Psychotria birotula* 20g.L<sup>-1</sup>= 6 alterations (Table 4 and Figure 2).

The different concentrations of *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* have an antiproliferative and genotoxic potential on the cell cycle of *Eruca sativa*, coinciding with the result observed by Souza et al. (2005) for the species *Cymbopogon citratus* on the cell cycles of *Eruca sativa* and *Lactuca sativa*. Furthermore, in a study carried out earlier by Prates et al. (2000), the extracts of *Leucaena leucocephala* demonstrated inhibitory effect both on root growth and MI of root cells in *Zea mays* seedlings.

The elongation of the shoots and roots depends directly on cell division (mitosis), the formation of cambium and xylem vessels, and these structures are dependent on the partition of nutrients by the seedling (Hoffmann et al., 2007). Thus, it is understood that in the present study, the interference in the mitotic index, also affected the development of roots, germination percentage, and the GVI of arugula seeds.

According to Souza Filho and Duarte (2007), allelopathy can have inhibitory or stimulatory effects, whereas in the present study the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* demonstrated an inhibitory allelopathic effect on the seeds of *Eruca sativa*.

The allelopathic, genotoxic and antiproliferative potential can be associated with the fact of *Psychotria brachypoda* producing the indole alkaloid psycholatine (Fragoso, 2007) and of *Psychotria birotula* producing the indole alkaloids meso-chimonanthine and chimonanthine (Brand et al., 2009), and since in the majority of the variables the inhibitory potential was more damaging in the higher concentrations, we believe it is due to the concentration of alkaloid present in the extract.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and Prof. Juçara Terzinha Paranhos and Prof<sup>a</sup> Thais Scott do Canto Dorow.

**REFERENCES**

Ayres M. 2007. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. Ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq.

Azambuja N., Hoffmann C.E.F., Neves L.A.S. & Goulart E.P.L. 2010. Potencial alelopático de *Plectranthus barbatus* Andrews na germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. e de *Bidens pilosa* L. Rev. Ciênc. Agrovet. **9**: 66-73.

Belinelo V. J., Czepak M. P., Filho S. A. V., Menezes L. F. T. & Jamal C. M. 2008. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. Rev. Caatinga. **21**: 12-16.

Borella J. & Pastorini L.H. 2009. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. Biotemas. **22**: 67-75.

Brand G., Ricardo L.L., Stain S.M.O., Henriques A.T. & Sarragiotto M.H. 2009. Alcalóides pirrolidino-indolínicos de *Psychotria birotula*. XVII Encontro de Química da Região Sul.

Carvalho S.I.C. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. 1993. 72f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1993.

Chou C.H. 1986. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. pp. 57-73. In: A.R. Putnan e C.S. Tang. The science of allelopathy. New York: John Wiley e Sons. Wiley, New York.

Chou C.H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. Crit. Rev. Plant. Sci. **18**: 609-636.

De Feo V., Simone F. & Senatore F. 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. J. Phytochemistry. **61**: 573-8.

Ferreira M.F., Souza J.R.P. & Faria T.J. 2007. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. Ciênc. agrotec. **31**: 1054-1060.



Fragoso V. Alcalóides de Psychotria: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

Friedman J. 1995. Allelopathy, autotoxicity, and germination. p.629-644. In: J. Kegel e G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker Inc., NewYork.

Gatti A.B., Perez S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta bot. bras. **18**: 459-472.

Guerra M. & Souza M.J. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec.

Hoffmann C.E.F., Neves L.A.S. & Goulart P.L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Rev. Ciênc. Agrovet. **6**: 1-21.

Lima C.P., Cunico M.M., Miguel O.G. & Miguel, M.D. 2011. Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. Rev Ciênc Farm Básica Apl. **32**: 83-87.

Mairesse L.A.S., Costa E.C., Farias J.R. & Fiorin R.A. 2007. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). Rev FZVA. **14**: 1-12.

Martins E. R., Castro D.M, Catellani D.C. & Dias J.E. 2000. Plantas Mediciniais. UFV, Viçosa, 220p.

Olguin C.A.F., Hamerski L., Percio M.F. & Somensi A. 2005. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. Varia Sci. **5**:137-43.

Oliveira S. C. C. 2009. 180f. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. Tese (PPG em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 2009.

Pessanha A. C., Santos L. M., Freitas S. P. & Huziwara, E. 2010. Efeito alelopático de extrato de *Schinus terebinthifolius* L. em *Brachiaria decumbens*. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas.

Pires N.M., Souza I.R.P., Prates H.T., Faria T.C.L., Pereira Filho I.A. & Magalhães P.C. 2001. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **13**: 55-65.

Prates H.T., Paes J.M.V., Pires N.M., Filho I.A.P. & Magalhães P.C. 2000. Efeito do extrato aquoso de Leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. *Pesq. Agropec. Bras.* **35**: 909-914

Rosado L.D.S., Rodrigues H.C.A., Pinto, J.E.B.P., Custódio T.N., Pinto L.B.B. & Bertolucci S.K.V. 2005. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. *Rev. Bras. Pl. Méd.* **11**: 422-428.

Stein V.C., Bobrowski V.L., Vargas D.P., Souza S.A.M. & Cattelan L.V. 2008. Atividade alelopática de extratos aquosos de diferentes Espécies de *Plantago* L. *Rev. Verde.* **1**: 146-150.

Souza Filho A.P.S. & Duarte M.L.R. 2007. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. *Planta Daninha.* **25**: 227-230.

Souza S. A. M., Stein V. C., Cattellan L. V., Bobrowski V. L. & Rocha, B. H. G. 2005. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. *Ver. Biol. Ciênc. Terra.* **5**: 1-8.

Viecelli C.A., Cruz-Silva C.T.A. 2009. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. *Semina: Ciênc Agrárias.* **30**: 39-46.

Weidenhamer J., Hartnett D. & Romeo J. 1989. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *J. Appl Ecol.* **26**: 613-624.

TABLE 1: Comparison of the mean root length, germination velocity index (GVI) and percentage of germination (%G) in each treatment.

Treatment	Mean of the root length	GVI	% G
T1: Negative control	1.68 <sup>a</sup>	23.06 <sup>a</sup>	59.95 <sup>a</sup>
T2: Positive control	0.78 <sup>c</sup>	6.84 <sup>c</sup>	16.66 <sup>c</sup>
T3: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	1.04 <sup>bc</sup>	21.93 <sup>a</sup>	54.94 <sup>ab</sup>
T4: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	0.85 <sup>c</sup>	18.98 <sup>b</sup>	50.59 <sup>b</sup>
T5: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	1.17 <sup>b</sup>	21.34 <sup>ab</sup>	55.11 <sup>ab</sup>
T6: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	1.25 <sup>b</sup>	20.31 <sup>ab</sup>	54.36 <sup>ab</sup>
C.V.(%)	14.24975	7.63594	10.26165

Means followed by the same letter do not differ by the Tukey test at 5% probability of error.

TABLE 2: Comparison among the means of germination of the contrasts (c) between 24, 48, and 72 hours and the significance of the estimated contrast.

Treatment	Contrasts					Means
	C1	C2	C3	C4	C5	
T1: Negative control	+5	0	0	0	0	30.73
T2: Positive control	-1	+4	0	0	0	3.13
T3: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 5g.L <sup>-1</sup>	-1	-1	+1	+1	0	28.00
T4: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 20g.L <sup>-1</sup>	-1	-1	+1	-1	0	21.26
T5: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 5g.L <sup>-1</sup>	-1	-1	-1	0	+1	26.53
T6: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 20g.L <sup>-1</sup>	-1	-1	-1	0	-1	24.13
X 24 hours	7.9*	-10.8*	1.4 <sup>ns</sup>	9.8 <sup>ns</sup>	7.8*	—
X 48 hours	11.8*	-26.6*	-1.7 <sup>ns</sup>	6.8*	-1.4 <sup>ns</sup>	—
X 72 hours	10.5*	-28.1*	-1.8 <sup>ns</sup>	3.6 <sup>ns</sup>	0.8 <sup>ns</sup>	—

\* contrast between significant means by the F test at 5% of probability of error;

ns between non-significant means by the F test at 5% of probability of error.

TABLE 3: Number of cells in interphase, mitosis, and mitotic index (MI) of root-tips of *Eruca sativa* for each treatment.

Treatment	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	MI (%)
T1: Negative Control	4794	153	33	13	7	4.12 <sup>a</sup>
T2: Positive Control	4946	23	12	17	2	1.08 <sup>b</sup>
T3: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	4900	68	23	8	1	2 <sup>b</sup>
T4: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	4930	50	14	6	0	1.40 <sup>b</sup>
T5: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	4926	56	13	5	0	1.48 <sup>b</sup>
T6: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	4914	52	21	9	4	1.75 <sup>b</sup>

Means followed by the same letter do not differ by the Chi-square test at 5% probability of error.

TABLE 4: Number of cells with chromosomal alterations in the root-tips of *Eruca sativa* for each treatment.

Treatment	Bridges in anaphase and telophase	Chromosomal breakage	Laggard chromosome	Total cells with alteration
T1: Negative control	0	0	0	0 <sup>a</sup>
T2: Positive control	0	12	13	25 <sup>b</sup>
T3: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 5 g.L <sup>-1</sup>	5	4	1	11 <sup>b</sup>
T4: Aqueous extract of <i>Psychotria brachypoda</i> 20 g.L <sup>-1</sup>	3	2	1	6 <sup>b</sup>
T5: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 5g.L <sup>-1</sup>	2	0	3	5 <sup>b</sup>
T6: Aqueous extract of <i>Psychotria birotula</i> 20g.L <sup>-1</sup>	3	0	3	6 <sup>b</sup>

Means followed by the same letter do not differ by the Chi-square test at 5% probability of error.

TABLE 5: Chi-square ( $\chi^2$ ) values for the comparisons between the Mitotic Index (MI) of each treatment and between the number of chromosomal alterations.

Treatment	$\chi^2$ values (MI)	$\chi^2$ values (chromosomal alterations)
T1xT2	91.234	24.938
T1xT3	37.878	10.988
T1xT4	68.917	5.996
T1xT5	64.021	4.998
T1xT6	50.798	5.996
T2xT3	13.955	5.425
T2xT4	2.090	11.609
T2xT5	3.166	13.294
T2xT6	7.418	11.609
T3xT4	5.386	1.468
T3xT5	3.954	2.246
T3xT6	1.074	1.468
T4xT5	0.113	0.091
T4xT6	1.667	0.000
T5xT6	0.915	0.091

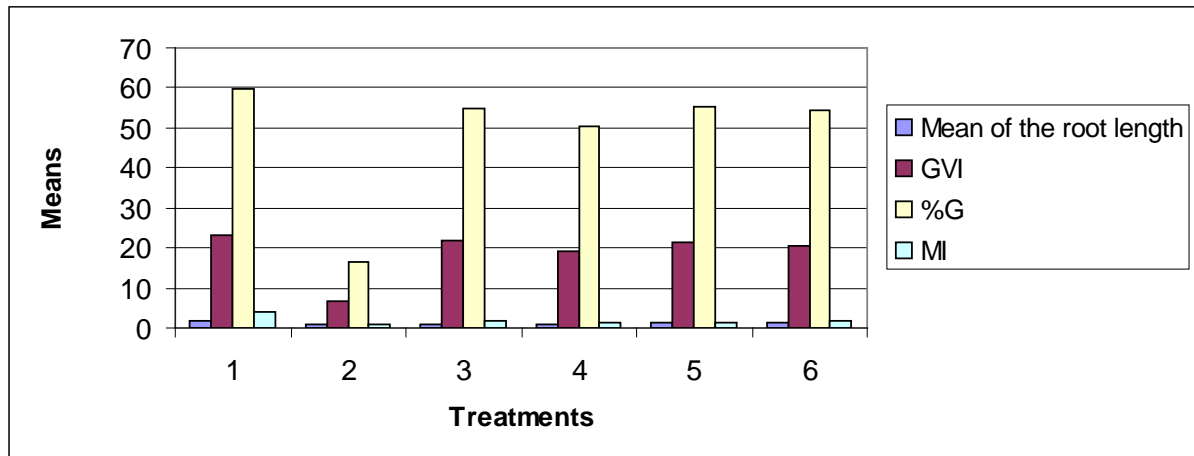


Figure 1: Comparison of the mean root length, germination velocity index (GVI), percentage of germination (%G) and mitotic index (MI) in each treatment.



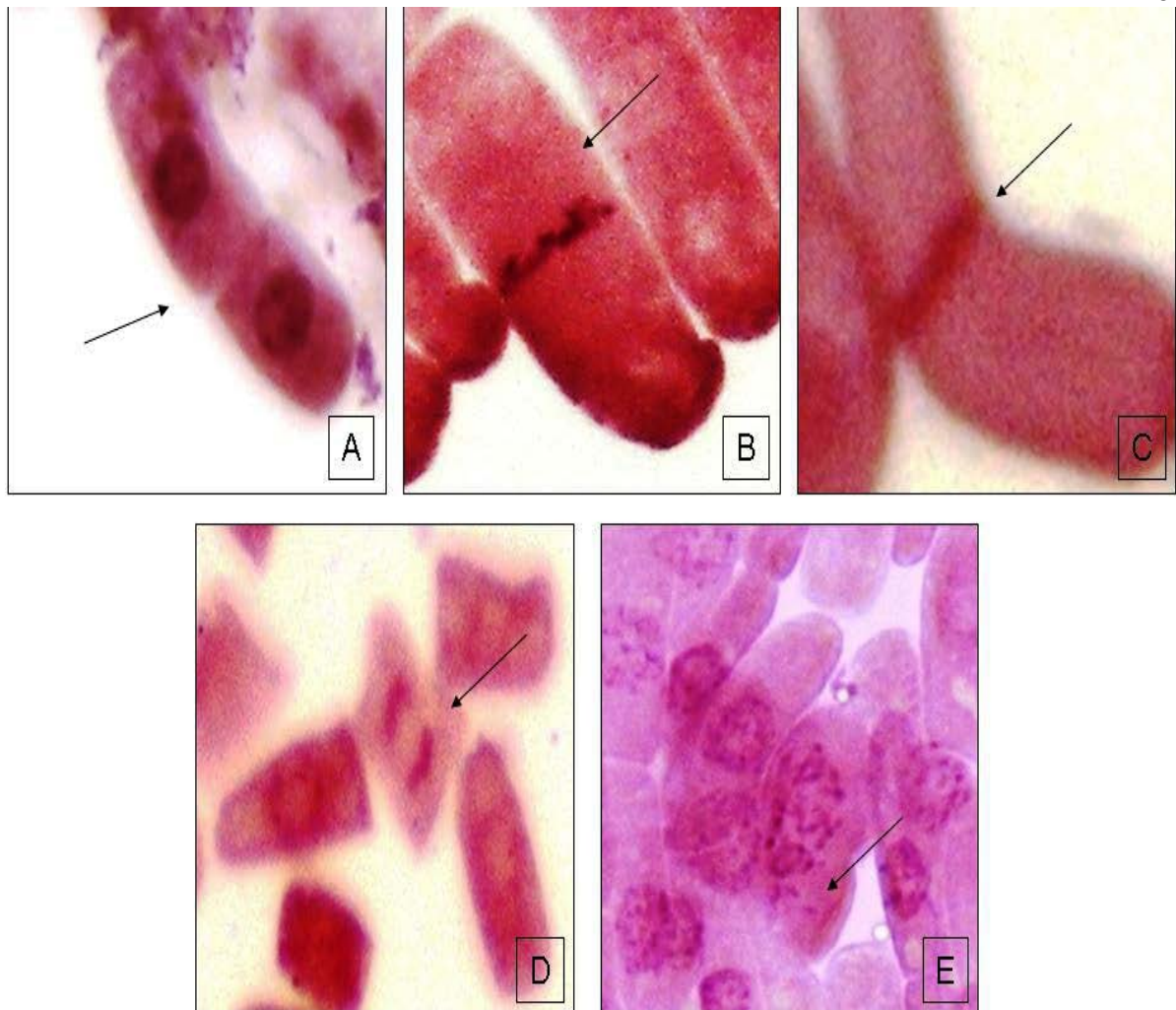


Figure 2: Meristematic root cells of *Eruca sativa* submitted to treatments. A) cells in interphase submitted to the treatment with the leaf extract of *Psychotria brachypoda*  $5\text{g.L}^{-1}$  ; B, C) cells in metaphase submitted to the leaf extract of *Psychotria brachypoda*  $20\text{g.L}^{-1}$  ; D) cell in telophase submitted to the leaf extract of *Psychotria birotula*  $20\text{g.L}^{-1}$  ; E) cell in prophase irregular submits to the leaf extract of *Psychotria birotula*  $5\text{g.L}^{-1}$

## DISCUSSÃO

Os resultados do estudo com o teste de *A. cepa* indicam que os extratos aquosos de *P. brachypoda* nas concentrações estudadas apresentam potencial antiproliferativo e este potencial é maior com o aumento da concentração. O mesmo resultado foi obtido no estudo realizado por Lubini et al. (2008), onde *P. myriantha* e *P. leiocarpa* apresentaram maior potencial antiproliferativo com o aumento da concentração dos extratos.

Outras espécies foram testadas em diferentes concentrações com o teste de *A. cepa* e a maior concentração inibiu a divisão celular, como por exemplo: *P. guajava* e *A. millefolium* (TEIXEIRA et al., 2003) *P. polystachyum* (Knoll et al., 2006); *A. satureioides* (FACHINETTO et al., 2007); *S. microglossa* (BAGATINI et al., 2009); *B. trimera* e *B. articulata* (FACHINETTO e TEDESCO, 2009); *T. occidentalis* (JORGE et al., 2009) e *M. glomerata* (DALLA NORA et al., 2010).

Os extratos de *P. birotula* nas concentrações estudadas apresentaram potencial inibitório da divisão celular, porém, ao contrário dos extratos de *P. brachypoda*, o potencial antiproliferativo foi maior na menor concentração ( $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Outras espécies do gênero *Psychotria* como *P. myriantha* e *P. leiocarpa* estudadas por Lubini et.al (2008) apresentaram maior potencial antiproliferativo com o aumento da concentração dos extratos, coincidindo com os resultados observados para *P. brachypoda*. No entanto, Fachinnetto et al. (2007) explicam que é possível que a alta concentração de alguns compostos químicos tenha um efeito inibitório ou estimulatório no ciclo celular e, no caso da espécie *P. brachypoda* o efeito foi inibitório enquanto para *P. birotula* o efeito foi estimulatório.

Os extratos de *P. brachypoda* não possuem potencial genotóxico. Já os extratos de *P. birotula*, pelo número de alterações significativo possuem potencial genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*. Estes mesmos resultados foram observados nas espécies *P. leiocarpa* e *P. myriantha*, sendo que os extratos da espécie *P. leiocarpa* não apresentaram potencial genotóxico e os extratos de *P. myriantha* demonstraram genotoxicidade sobre o ciclo celular de *A. cepa* (LUBINI et.al, 2008).

Algumas espécies de importância medicinal foram testadas e apresentaram potencial antimutagênico como as espécies *Aloe vera* (STURBELLE et al., 2010). *P.*

guajava e *A. millefolium* (TEIXEIRA et al., 2003), porém, as espécies *P. brachypoda* e *P. birotula* não apresentam esse potencial nas concentrações estudadas.

As espécies *P. brachypoda* e *P. birotula* apresentam potencial antiproliferativo e genotóxico sobre o ciclo celular de *E. sativa*, e esse mesmo resultado foi observado por Souza et al. (2005) em estudo realizado com a espécie medicinal *C. citratus*.

*P. brachypoda* e *P. birotula* possuem potencial antiproliferativo sobre a germinação, ou seja, potencial alelopático sobre sementes da espécie *E. sativa*, sendo que outras espécies foram testadas e também apresentaram potencial alelopático, como por exemplo: *Schinus terebinthifolius* (PESSANHA et al., 2010), *Plectranthus barbatus* (AZAMBUJA et al., 2010), *L. leucocephala* (PRATES et al., 2000; PIRES et al., 2001) dentre outras.

Os potenciais alelopático, genotóxico e antiproliferativo podem estar associados ao fato de *P. brachypoda* produzir o alcalóide indólico psicolatina, (FRAGOSO, 2007) e a *P. birotula* produzir os alcalóides indólicos mesochimonantina e chimonantina (BRAND et al., 2009), e acredita-se que seja pela concentração de alcalóide presente no extrato.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que as espécies *P. brachypoda* e *P. birotula* apresentam potencial antiproliferativo, sendo que no caso da espécie *P. brachypoda* o maior potencial de inibição do índice mitótico ocorre com a maior concentração e a espécie *P. birotula* tem maior potencial antiproliferativo na menor concentração.

Os extratos de *P. brachypoda* não possuem potencial genotóxico, enquanto os extratos de *P. birotula*, pelo número de alterações significativo em relação aos controles possui potencial genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*.

Os extratos aquosos das espécies estudadas, em ambas as concentrações não apresentam potencial antimutagênico.

Conclui-se ainda, que as espécies medicinais *P. brachypoda* e *P. birotula* possuem potencial antiproliferativo, ou seja, potencial alelopático sobre sementes da espécie *Eruca sativa* e antiproliferativo sobre o ciclo celular de *E. sativa*, diminuindo o índice mitótico e afetando a divisão celular, o que conseqüentemente está relacionado com o desenvolvimento das raízes que depende de mitose para o seu crescimento e os extratos de ambas as espécies nas concentrações estudadas apresentaram potencial genotóxico sobre o ciclo celular de *E. sativa*.

Os resultados referentes aos potenciais antiproliferativo e genotóxico de *P. brachypoda* e *P. birotula* despertam cada vez mais preocupação do ponto de vista ambiental em relação ao organismo humano, pois resultados provenientes de bioensaios genéticos como o teste de *A. cepa*, bem como o bioensaio com células de *E. sativa* são relevantes à saúde humana em função do alvo ser a célula eucariótica e, o estudo da alelopatia dos extratos das espécies em estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de substâncias a serem utilizadas no manejo e produtividade de culturas e em estudos sobre ecologia.

## REFERÊNCIAS

ALVES, C. C. F.; et al. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e ambiente**, Seropédica, v.10, n.1, p. 93 -97, jan/dez. 2003.

ALVES, M. C. S.; et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, nov. 2004.

AZAMBUJA, N. et al. Potencial alelopático de *Plectranthus barbatus* Andrews na germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. e de *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciência Agroveterinária**, Lages, v.9, n. 1, p. 66-73. 2010.

BAGATINI, M. D.; et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, p. 632-636. 2009.

BELINELO, V. J. et al. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 4, p.12-16, out/dez. 2008.

BRAND, G. et al. Alcalóides pirrolidino-indolínicos de *Psychotria birotula*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 17. 2009, Rio Grande. **Anais...** Rio Grande: FURG e Sociedade Brasileira de Química. Sem página, 2009.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 211-214, mai.1999.

CAMPAROTO, M. L.; et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.25, n. 1, p.85-89. 2002.

CHAUAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.42, n. 3, p.181-189, dez. 1999.

CHOU, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v.18, n.5, p.609-636. 1999.

CHOU, C. H. The role of allelopathy in subtropical agroecosystems of Taiwan. In: A.R. Putnan e C.S. Tang. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley e Sons, v., n., p.57-73. 1986

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, Mendoza, v. 34, p. 85-101. 2010.

DE FEO, V.; SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 573-8, nov. 2002.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense: Rubiáceas**. Santa Catarina: Herbário Barbosa Rodrigues.

DILLENBURG, C. R.; PORTO, M. L. Tribo *Psychotrie*. **Boletim Instituto de Biociências da UFRGS**, 1985. 76p.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 10-15. 2003.

FACHINETTO, J. M. et al., Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan/mar. 2007.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 360-367, out/dez. 2009.

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

FRAGOSO, V. **Alcalóides de Psychotria: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas**. 2007, 124f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

FRAGOSO, V. et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 3, p. 559-566, abr. 2008.

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.

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

LAJIS, N. H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R. F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 59, n. 4, p. 383-384, ago. 1993.

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

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, Reino Unido, v. 24, n. 4, p. 471-486, mai. 1938.

LOPES, S. O. **Análise química e cultivo *in vitro* de *Psychotria leiocarpa* Cham. et Schlecht. e *Psychotria cartagenensis* Jacq. (Rubiaceae)**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1998.

LUBINI, G. et al. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, Bratislava, v. 63, n. 5, p. 647-651, out. 2008.

MACÍAS, F. A.; et al. Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 631-636. 1998.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Mediciniais**. Viçosa : UFV, 2000. 220p.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K.J. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. **Systematic Botany**, Laramie WY, v.24, n.1, p.5-27, jan/mar 1999.

NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, mai/jun. 2003.

OLIVEIRA, S. C. C. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal.** 2009. 180 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

OLGUIN, C. A. F. et al. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. **Varia Scientia**, Cascavel, v. 5, n. 10, p.137-43, dez. 2005.

PARANHOS, J.T. **Produção de alcalóides bioativos em *Psychotria umbellata* Vell. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.** 2003. (Tese de Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

PERRY, L. M. Rubiaceae. **In: Medicinal plants of east and southeast.** Cambridge: MIT Press, p. 347-360, 1980.

PESSANHA, A. C. et al. Efeito alelopático de extrato de *Schinus terebinthifolius* L. em *Brachiaria decumbens*. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. 2010.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** Campinas, V. 13, p. 55-65. 2001.

PRATES, H. T. et al. Efeito do extrato aquoso de Leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p.909-914, maio. 2000.

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

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Bot Belg* 1: 1-271. 1988.

ROBERTS, M. F.; STRACK, D. Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. **In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews**, Boca Raton, v.1, p.17-78. 1999.

SILVA, C.R. et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** João Pessoa, v.14, p. 1-3. 2004.



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

SMITH, A. E.; MARTIN, D. L. Allelopathic characteristics of three cool-season grass in the forage ecosystems. **Agronomy Journal**, v. 8, n. 2, p. 243-246. 1994.

SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.7, n. 1, p.190-197, jan/dez. 2000.

SOUZA, S. A. M. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Biológica e Ciências da Terra**, Campina Grande, vol. 5, n. 1, sem página, jan/ago. 2005.

STURBELLE, R. T. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 20, n. 3, p. 409-415, jun/jul. 2010.

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

VICELLI, C. A.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 30, n. 1, p. 39-46, jan/mar. 2009.

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

VIEIRA, D.; VICENTINI, V.E.P. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa*. 42º Congresso Nacional de Genética, Goiânia. **Genetics and Molecular Biology (Supplement)**, São Paulo, v. 20, p. 115-115. 1997.

WEIDENHAMER, J.; HARTNETT, D.; ROMEO, J. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal of Applied Ecology**, Grã Betanha, v.26, n. 2, p. 613-624, ago. 1989.

ZHANG, X. Regulatory Situation of Herbal Medicines. **Bulletin of the World Health Organization**, 1998.