

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

**PROPAGAÇÃO E GENOTOXICIDADE DE
Alternanthera brasiliana (L.) KUNTZE
(AMARANTHACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Nery Rocha

Santa Maria, 2013

**PROPAGAÇÃO E GENOTOXICIDADE DE *Alternanthera
brasiliensis* (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE)**

Bruna Nery Rocha

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

Orientador: Prof^a Dr^a Juçara Terezinha Paranhos

**Santa Maria, RS – Brasil
2013**

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

Nery Rocha, Bruna

Propagação e genotoxicidade de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze
(Amaranthaceae) / Bruna Nery Rocha.-2013.

98 f.; 30cm

Orientador: Juçara Terezinha Paranhos

Coorientadores: Hilda Hildebrand Soriani, Melânia Palermo Manfron,
Solange Bosio Tedesco

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

1. Penicilina 2. Propagação 3. Teste *Allium cepa* 4. Micropropagação 5.
Estaquia I. Paranhos, Juçara Terezinha II. Hildebrand Soriani, Hilda III. Palermo
Manfron, Melânia IV. Bosio Tedesco, Solange V. Título.

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


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

**PROPAGAÇÃO E GENOTOXICIDADE DE *Alternanthera brasiliana*
(L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE)**

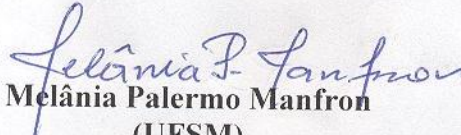
elaborada por
Bruna Nery Rocha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

Comissão Examinadora:


Juçara Tereziinha Paranhos, Dr.^a
(Presidente/Orientador)


José Antonio Peters
(UFPel)


Melânia Palermo Manfron
(UFSM)

Santa Maria, 24 de maio de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pilares da minha construção, meus pais Rosa Marli e Francisco pelo amor e dedicação nos momentos mais difíceis, meu noivo Alison pelo incentivo incansável de todos os dias, apesar da distância, e minha irmã Renata pelo apoio e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em todos os passos que dei até hoje, pelas conquistas maravilhosas que alcancei, pela força e saúde para conquistar meus objetivos.

Agradeço aos anjos que tenho ao meu lado, meus pais Rosa Marli e Francisco, meu noivo Alison e minha irmã querida Renata.

Aos meus pais e ao Alison pelas longas idas e vindas de Uruguaiana à Santa Maria, sempre que necessário, para me dar apoio e força sem medir esforços, pelo carinho, amor, paciência e incentivo acima de tudo, pelos dias em que deixaram seus compromissos de lado para ajudar no meu trabalho. Obrigada pai pela manhã que passou calor na estufa. Obrigada mãe por estar presente até mesmo quando precisei fazer as avaliações no fim de semana, obrigada Alison por esperar todo o sábado no laboratório para que pudéssemos passar algumas horas juntos. Obrigada mana pelas mensagens de incentivo e força enviadas nos momentos mais difíceis, não imagina como faziam efeito. Vocês são fundamentais na minha vida e na construção da minha caminhada profissional.

Agradeço as amigas Terezinha, Eni e Priscila que fizeram o papel de uma segunda família para mim nos dois anos e meio que morei em Santa Maria, obrigada pelo carinho e por lembrarem de mim sempre.

Agradeço a amiga Paula, pelo exemplo de coragem e força que me incentivaram a enfrentar o medo e seguir em frente.

Agradeço a Professora Juçara pela oportunidade de poder dar mais um passo, importantíssimo, na minha caminhada profissional. Obrigada pelo aprendizado que passou, por ter confiado e apostado em meu trabalho. Obrigada até mesmo pelos puxões de orelha quando necessário e pela rigidez que foram e são fundamentais para a minha formação como profissional.

Agradeço as colegas Lisiane e Rosiana por estarem sempre presentes na montagem dos experimentos, pela amizade e paciência. Obrigada Lisi pelas gargalhadas de descontração deixando nossos dias cansativos muito mais leves, por ligar a rádio na Tchê Fm para que tudo se torna-se mais descontraído. Obrigada pela mão amiga e pelo incentivo acima de tudo, és uma pessoa merecedora de muito sucesso! A estas queridas amigas e colegas, Lisiane e Rosiana, peço que nunca nos esqueçamos de nossa amizade apesar da distância.

Agradeço a Hilda e a Amanda que estiveram sempre dispostas a ajudar nas avaliações e contribuir com o meu trabalho.

Agradeço aos professores das disciplinas realizadas, pelo aprendizado que passaram a mim. As colegas de aula do mestrado, pela companhia e companheirismo, a funcionária Tânia pela ajuda nos experimentos e aos estagiários que em vários momentos sacrificaram até mesmo seus fins de semana para auxiliar no meu trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

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

PROPAGAÇÃO E GENOTOXICIDADE DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE)

AUTORA: BRUNA NERY ROCHA
ORIENTADOR: JUÇARA TEREZINHA PARANHOS
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de maio de 2013.

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze (Amaranthaceae) é um espécie conhecida como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho. Trabalhos comprovam que o extrato das folhas apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. Com base no uso medicinal desta espécie o trabalho visou propagar vegetativamente *in vitro* e *ex vitro* *A. brasiliana*, e avaliar o potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico do extrato aquoso das folhas de plantas provenientes de quatro sistemas de cultivo, através do Teste *Allium cepa*, bem como a quantificação do conteúdo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico. Na propagação por estaquia de ramos aéreos *ex vitro* foram utilizadas estacas apicais, medianas e basais tratadas em meio nutritivo MS (0 e 20%) com acréscimo de AIB ao meio líquido (0,0 e 2,5 mg L⁻¹). Para a micropropagação foram utilizados segmentos apicais e nodais inoculados em meio MS com as combinações de ANA (0,0 e 0,05 mg L⁻¹) e BAP (0,0 e 0,5 mg L⁻¹). Nas avaliações do potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico, raízes de bulbos de *Allium cepa* foram imersas por 24 horas em extratos aquosos por infusão das folhas secas de *A. brasiliana* de quatro proveniências: Campus da UFSM; micropropagação; estaquia e casa de vegetação, todos com concentrações de 5 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹. Estes mesmos extratos foram utilizados para a quantificação dos metabólitos secundários, polifenóis e flavonoides, através de espectrofotômetro e ácido clorogênico através de cromatografia líquida de alta eficiência. Estacas apicais, medianas e basais podem ser utilizadas na propagação, apresentando porcentagem de enraizamento e sobrevivência acima de 62%. Em geral, plantas provenientes de estacas medianas e basais apresentam melhores resultados que as apicais, sugerindo que estas seriam as mais adequadas na produção de mudas. Na micropropagação *in vitro* os segmentos apicais apresentaram resultados significativamente superiores aos segmentos nodais e o uso de fitoreguladores Ácido naftalenoacético (ANA) (0,05 mg L⁻¹) e Benzilaminopurina (BAP) (0,5 mg L⁻¹) não foi significativo. As plantas regeneradas *in vitro* aclimatizadas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a porcentagem de sobrevivência máxima (72,57%) ocorreu em plantas provenientes de segmentos apicais com meio acrescido de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. No teste *Allium cepa* foi observado que o índice mitótico é superior em células de *A. cepa* submetidas aos extratos de folhas do campo (5 g L⁻¹) e extrato de folhas da estaquia (20 g L⁻¹), não diferindo do controle negativo em água destilada. Os demais tratamentos apresentaram potencial anti-proliferativo com a redução do índice mitótico, não diferindo do controle positivo em glifosato 5%. Apenas o extrato das folhas da casa de vegetação (20 g L⁻¹) apresentou efeito genotóxico às células de *A. cepa*, onde o número de células com alterações cromossômicas não diferiu do controle positivo. Ocorreu atividade anti-mutagênica do extrato de folhas do Campus da UFSM (20 g L⁻¹), sobre as células de *A. cepa*, submetidas à alteração em glifosato 5%, recuperando-se do efeito mutagênico. Quanto à quantificação dos

metabólitos ocorreu maior concentração de polifenóis flavonoides e ácido clorogênico nas amostras coletadas do campo.

Palavras-chave: Penicilina. Propagação. Teste *Allium cepa*.

ABSTRACT

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

PROPAGATION AND GENOTOXICITY OF *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE
(AMARANTHACEAE)

AUTHOR: BRUNA NERY ROCHA
ADVISER: JUÇARA TEREZINHA PARANHOS
Santa Maria May 24, 2013.

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze (Amaranthaceae) is a species known as penicilina, terramicina, doril or carrapichinho. Studies have proved that the extract of the leaves has analgesic, anti-inflammatory and healing. Based on the medicinal use of this species work aimed to propagate vegetatively *in vitro* and *ex vitro* *A. brasiliana*, and to evaluate the genotoxic, anti-proliferative and anti-mutagenic aqueous extract of the leaves of plants from four cropping systems through the *Allium cepa* test as well as the quantification of the content of polyphenols, flavonoids and chlorogenic acid. Propagation by cuttings of new shoots *ex vitro* were used, apical, medium and basal cuttings treated medium MS (0 and 20%) with addition of AIB to the liquid medium (0.0 and 2.5 mg L⁻¹). For micropropagation were used apical and nodal segments were inoculated on MS medium with combinations of NAA (0.0 and 0.05 mg L⁻¹) and BAP (0.0 and 0.5 mg L⁻¹). Evaluations of potential genotoxic, anti-proliferative and anti-mutagenic, roots of *Allium cepa* bulbs were immersed for 24 hours in aqueous extracts by infusion of the dried leaves of *A. brasiliana* four sources: Campus UFSM; micropropagation, cuttings and greenhouse, all with concentrations of 5 and 20 g L⁻¹. The same extracts were used for the quantification of secondary metabolites, flavonoids and polyphenols, through spectrophotometer and chlorogenic acid by high performance liquid chromatography. Apical cuttings, median and basal can be used for propagation presenting rooting and survival above 62%. In general, plants from middle and basal cuttings show better results than the apical, suggesting that these would be the most suitable for the production of seedlings. *In vitro* micropropagation apices showed significantly higher results for nodal segments and the use of growth regulators naphthaleneacetic acid (NAA) (0.05 mg L⁻¹) and benzylaminopurine (BAP) (0.5 mg L⁻¹) was not significant. Plants regenerated *in vitro* acclimatized showed no significant difference between treatments, with the highest survival percentage (72.57%) occurred in plants from the apical medium supplemented with 0.05 mg L⁻¹ NAA and 0, 5 mg L⁻¹ BAP. In *Allium cepa* was observed that the mitotic index is superior in cell subjected to leaf extracts from the field (5 g L⁻¹) and leaf extract of cuttings (20 g L⁻¹) did not differ from the negative control in distilled water. The other treatments showed potential anti-proliferative with reduced mitotic index did not differ from the positive control in glyphosate 5%. Only the extract of the leaves of the greenhouse (20 g L⁻¹) cells to genotoxic effects of *A. cepa*, where the number of cells with chromosomal abnormalities did not differ from the positive control. Occurred anti-mutagenic activity of the leaf extract of Campus UFSM (20 g L⁻¹), on the cells of *A. cepa*, undergoing changes in glyphosate 5%, recovering from the mutagenic effect. Regarding the quantification of metabolites produced

higher concentration of polyphenols and flavonoids chlorogenic acid in the samples collected from the field.

Key words: Penicillin. Propagation. *Allium cepa* test.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Vista geral de estacas e plantas enraizadas de *Alternanthera brasiliana* mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $35 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias durante 21 dias (A) e em casa de vegetação com temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 27 dias (B), respectivamente..... 20

CAPÍTULO III

- Figura 1 – Células de *A. cepa* submetidas aos extratos aquosos de *A. brasiliana*, controle negativo e controle positivo. Seta indicando prófase normal (A); setas indicando metáfase normal (B); seta indicando anáfase normal (C); seta indicando telófase normal (D); seta indicando cromossomo perdido (E); seta indicando anáfase com ponte (F) e seta indicando cromossomos desorganizados (G)..... 49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Resumo da análise de variância das variáveis: Comprimento da maior raiz (CMR), Número de Raízes (NR), Número de Folhas (NF), Massa Fresca Total (MFT), porcentagem de enraizamento (E) e porcentagem de sobrevivência (S) nos Tipos de estacas (TE), Tipos de solução nutritiva (TSN) e Concentrações de fitorregulador (CF) em estacas de <i>Alternanthera brasiliana</i> . Santa Maria, RS, 2012.....	23
Tabela 2 – Porcentagem de enraizamento e sobrevivência das estacas apicais, medianas e basais de ramos aéreos de <i>Alternanthera brasiliana</i> submetidas aos tratamentos, Santa Maria- RS, 2012.....	24
Tabela 3 - Número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) em estacas apicais, medianas e basais de <i>Alternanthera brasiliana</i> submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%) e AIB (0,0 e 2,5 mg L ⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.....	26
Tabela 4 - Número de folhas novas e massa fresca total de estacas apicais, medianas e basais de <i>Alternanthera brasiliana</i> submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%) e AIB (0,0 e 2,5 mg L ⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.....	27
Tabela 5 - Resumo da análise de variância das variáveis: Altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR), área foliar (AF), massa fresca das folhas (MFF), massa fresca das raízes (MFR), massa fresca do caule (MFC), massa seca das folhas (MSF), massa seca das raízes (MSR) e massa seca do caule (MSC) nos Tipos de estaca (TE), Tipos de solução nutritiva (TSN) e Concentrações de Fitorregulador AIB (CF) em plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> provenientes da propagação por estaquia. Santa Maria, RS, 2012.....	28
Tabela 6 - Altura da parte aérea de plantas de <i>A. brasiliana</i> provenientes de estacas apicais medianas e basais submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%). Santa Maria, RS, 2012.....	29
Tabela 7 - Tabela 7 - Massa fresca das raízes de plantas de <i>A. brasiliana</i> provenientes de estacas apicais, medianas e basais submetidas a tratamentos com AIB (0,0 e 2,5 mg L ⁻¹) fluxo de 15 dias, acrescido ao substrato. Santa Maria, RS, 2012.....	29
Tabela 8 - Resumo da análise de variância das variáveis: Número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de contaminação fúngica (CF) e porcentagem de contaminação bacteriana (CB) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de Fitorreguladores (CF) em plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> micropropagadas <i>in vitro</i> aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.....	30
Tabela 9 - Resumo da análise de variância das variáveis: Número de Folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fúngica (CF), porcentagem de contaminação bacteriana (CB) e explantes sem resposta (ESR) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de fitorreguladores (CF) em plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> micropropagadas <i>in vitro</i>	

	aos 28 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.....	31
Tabela 10 -	Efeito dos explantes apicais e nodais no número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de contaminação fúngica (CF) e porcentagem de contaminação bacteriana (CB) de <i>A. brasiliana</i> micropropagadas <i>in vitro</i> aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.....	32
Tabela 11 -	Efeito dos explantes apicais e nodais no número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fúngica (CF), porcentagem de contaminação bacteriana (CB) e porcentagem de explantes sem resposta (SR) de <i>A. brasiliana</i> micropropagadas <i>in vitro</i> aos 28 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.....	32
Tabela 12 -	Altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fúngica (CF) e contaminação bacteriana (CB) aos 28 dias em explantes de <i>Alternanthera brasiliana</i> cultivados <i>in vitro</i> em meio MS com combinações de ANA (0,0 e 0,05 mg L ⁻¹) e BAP (0,0 e 0,5 mg L ⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.....	34
Tabela 13 -	Número de folhas e porcentagem de enraizamento aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> , e número de brotos aos 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> em explantes apicais e nodais cultivados em meio MS contendo as combinações de ANA (0,0 e 0,05 mg L ⁻¹) e BAP (0,0 e 0,5 mg L ⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.....	34
Tabela 14 -	Resumo da análise de variância das variáveis: Número de Folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CMR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), área foliar (AF) e porcentagem de sobrevivência (S) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de Fitorreguladores (CF) em plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> micropropagadas <i>in vitro</i> e aclimatizadas durante 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.....	35
Tabela 15 -	Efeito do tipo de explante (TE) (Apical e Nodal) e da combinação de fitorreguladores sobre a altura da parte aérea (APA) e massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> provenientes da micropropagação <i>in vitro</i> , aclimatizadas durante 60 dias.....	36
Tabela 16 -	Efeito do tipo de explante (TE) (Apical e Nodal) sobre a área foliar (cm ²) de plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> provenientes da micropropagação <i>in vitro</i> , aclimatizadas durante 60 dias.....	36
Tabela 17 -	Efeito da combinação de fitorreguladores (CF) sobre a área foliar (cm ²) de mudas de <i>Alternanthera brasiliana</i> provenientes da micropropagação <i>in vitro</i> , aclimatizadas durante 60 dias.....	37
Tabela 18 -	Efeito do tipo de segmento e da combinação de fitorreguladores (concentração em mg L ⁻¹) sobre a porcentagem de sobrevivência de plantas de <i>Alternanthera brasiliana</i> provenientes da micropropagação <i>in vitro</i> , aclimatizadas durante 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.....	37

CAPÍTULO III

Tabela 1 -	Total de células analisadas (TCA), Número total de células em mitose do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> (TCM), índice mitótico (IM), células
------------	--

em Interfase (I), Prófase (P), Metáfase (M), Anáfase (A) e Telófase (T) submetidas aos tratamentos com extrato aquoso das folhas secas de <i>A. brasiliiana</i> provenientes de quatro sistemas de cultivo. Santa Maria – RS.....	49
Tabela 2 - Média do número total de células em mitose do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> , Cromossomos perdidos (CP), Anáfases com ponte (AP), Cromossomos desorganizados (CD) e Total de células com anormalidades (TCA), submetidas aos tratamentos com extrato aquoso das folhas secas de <i>A. brasiliiana</i> provenientes de quatro sistemas de cultivo. Santa Maria – RS.....	53
Tabela 3 - Conteúdo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico nas amostras de extrato aquoso das folhas apicais secas de plantas do campus da UFSM (C), casa de vegetação (CV), micropropagação (M) e estacas (E) de <i>Althernanthera brasiliiana</i>	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	3
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Plantas Medicinais.....	3
1.2 Família Amaranthaceae e Gênero <i>Alternanthera</i>	4
1.3 <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.....	5
1.4 Propagação vegetativa.....	6
1.5 Potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico.....	9
2 REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO II - PROPAGAÇÃO VEGETATIVA <i>ex vitro</i> E <i>in vitro</i> DE <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.)KUNTZE	17
RESUMO	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Enraizamento de estacas.....	19
2.2 Micropropagação <i>in vitro</i>	20
2.3 Análise Estatística.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Enraizamento de Estacas.....	22
3.2 Micropropagação <i>in vitro</i>	29
4 CONCLUSÕES	36
5 REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO III - POTENCIAL GENOTÓXICO, ANTI-PROLIFERATIVO E ANTI-MUTAGÊNICO DE <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE) NO CICLO CELULAR DE <i>Allium cepa</i>	40
RESUMO	41
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Teste <i>Allium cepa</i>	43
2.2 Quantificação de Polifenóis totais e Flavonoides e Quantificação de ácido clorogênico e quercetina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE).....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Teste <i>Allium cepa</i>	46
3.2 Quantificação de Polifenóis totais e Flavonoides e Quantificação de ácido clorogênico e quercetina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE).....	51
4 CONCLUSÕES	52
5 REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais são utilizadas no tratamento de enfermidades desde a época das antigas civilizações. Segundo a organização mundial da saúde, cerca de 60- 80% da população mundial nos países em desenvolvimento, dependem das plantas medicinais para tratamentos terapêuticos, devido à falta de recursos financeiros e consequente inacessibilidade à medicina tradicional (CALIXTO, 2005).

Com base no extrativismo decorrente do interesse econômico e popular por estas espécies, pesquisas demonstram que a chamada megabiodiversidade ocorrente em alguns países, dentre eles o Brasil, está ameaçada, sendo necessário encontrar formas de utilizá-las sustentavelmente, conservando e reparando áreas degradadas com a reposição destas espécies (NODARI; GUERRA, 1999).

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida popularmente como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho, sendo as inflorescências utilizadas para dores de cabeça, resfriados e gripes; as folhas como antitérmico e as raízes contra diarreia (AGRA et al., 2007).

Apesar das plantas medicinais apresentarem benefícios à saúde, alguns efeitos colaterais podem surgir decorrentes da toxidez dos extratos, altas dosagens ou interação com outros medicamentos, sendo necessário obter informações fitoquímicas da planta e métodos que padronizem um sistema de cultivo adequado e em larga escala. Assim são fundamentais estudos que visem à propagação destas espécies e a investigação de seus efeitos genotóxicos, anti-proliferativos e anti-mutagênicos sobre as células.

Dentre as formas de propagação estão a sexuada, através da germinação de sementes e a vegetativa, através de órgãos como caules, rizomas, tubérculos, bulbos, folhas ou raízes para formar uma nova planta. A propagação vegetativa através da estaquia apresenta algumas vantagens: é uma técnica simples, de baixo custo e produz um grande número de plantas com características genéticas da planta mãe (HARTMANN et al., 2002).

Outra forma de propagação vegetativa é a micropropagação, a qual é uma ferramenta em potencial para espécies medicinais, proporcionando a produção de plantas homogêneas e de qualidade, conservando o germoplasma e contribuindo para a seleção e melhoramento de genótipos a serem utilizados pela indústria farmacêutica (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Estes dois sistemas de propagação vegetativa podem ser utilizados para obtenção de plantas uniformes, entretanto, existem diferenças entre os ambientes de cultivo *in vitro* e *ex*

vitro, tais como, umidade relativa do ar, nutrientes, composição de gases e tipos de substrato (HAZARIKA, 2003).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) os fatores composição do solo, estresse hídrico, temperatura, umidade, radiação ultravioleta, radiação solar e ataque de patógenos podem interferir na produção e acúmulo de metabólitos secundários, como taninos e flavonoides. Podendo, portanto, tornar as plantas benéficas ou tóxicas para o consumo de chás e preparo de medicamentos pelas indústrias, fazendo-se necessária a padronização do material vegetal para utilização pela população e pela indústria (HE et al., 1996).

Vicentini et al. (2001), relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Entretanto Silva et al. (2004) afirmam que o consumo de chás pode suprimir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano. Trabalhos relatam que o extrato de espécies *Psidium guajava*, *Achillea millefolium* e *Plantago lanceolata* apresentam ação anti-mutagênica sobre as células (TEIXEIRA et al., 2003; ÇELIK; ASLANTÜRK, 2006, respectivamente). A atividade anti-mutagênica desses extratos vegetais é proporcionada pela presença de compostos bioativos, tais como os flavonoides, que já apresentam atividade antioxidante reconhecida (VARANDA et al. 1999).

Para identificar possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos sobre as células vegetais o sistema teste *Allium cepa* tem apresentado resultados efetivos. Este teste é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) sendo considerado eficiente na análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004). Através do teste também pode ser observado o efeito dos extratos vegetais sobre o ciclo mitótico das células do meristema radicular de *A. cepa* (cebola).

Assim objetivou-se propagar e avaliar a genotoxicidade de *Alternanthera brasiliana*, obtendo plantas através da micropropagação e do enraizamento de estacas *ex vitro*, avaliando o potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico dos extratos obtidos de plantas do campus da UFSM, micropropagação, estaquia e cultivadas em casa de vegetação, através do Teste *Allium cepa* e quantificando os metabólitos secundários presentes nos extratos de plantas dos quatro sistemas de cultivo.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Plantas Medicinais

As plantas são consideradas como uma importante fonte de compostos bioativos, sendo utilizadas pela população para diversos fins terapêuticos. Foi na antiguidade Egípcia, Grega e Romana que os conhecimentos sobre plantas medicinais foram transmitidos, principalmente pelos árabes, aos herdeiros destas civilizações, provando que desde os primórdios as plantas são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades (YUNES; CALIXTO, 2001).

O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribui para a divulgação da atividade terapêutica de determinadas espécies vegetais, que são administradas visando à cura de enfermidades, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MASCIEL et al., 2002).

Os compostos responsáveis pela atividade medicinal de diversas plantas são os metabólitos secundários produzidos por elas, os quais têm papel fundamental na proteção da planta contra predadores, produzindo toxinas contra o agente invasor, promovendo resistência a infecções e absorvendo os raios ultravioleta (YUNES; CALIXTO, 2001).

Nos últimos anos, o uso destas espécies tornou-se cada vez mais expressivo, devido à falta de acesso de grande parte da população aos métodos tradicionais da medicina, principalmente em países como o Brasil. Além de serem utilizadas pela população, as plantas medicinais também são um recurso para as indústrias farmacêuticas na produção de novos fármacos, estimando-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis são provenientes direta ou indiretamente de fontes naturais como, plantas, microrganismos e animais (CALIXTO, 2005). Apesar do vasto conhecimento popular sobre as espécies medicinais ainda são necessários estudos sobre a composição fitoquímica e os efeitos colaterais destes vegetais, para a produção de fármacos e a ingestão de chás com segurança.

1.2 Família Amaranthaceae e Gênero *Alternanthera*

A família Amaranthaceae foi estabelecida por A. L. Jussieu em 1789 e segundo Souza e Lorenzi (2012) inclui cerca de 170 gêneros e 2000 espécies de distribuição cosmopolita, exceto as regiões mais frias do Hemisfério Norte. No Brasil há cerca de 20 gêneros e 150 espécies, e no Rio Grande do Sul 11 gêneros e 43 espécies, sendo o gênero *Alternanthera* o mais representativo, com 11 espécies (MARCHIORETTO et al., 2008).

Diversas espécies pertencentes a esta família são utilizadas como ornamentais e medicinais, podendo ser encontradas em ambientes abertos e no interior de florestas. São ervas comumente suculentas menos frequentemente lianas, subarbustos ou arbustos, de folhas alternas ou opostas, simples, sem estípulas. Inflorescência cimosa ou racemosa, geralmente muito densa com flores não vistosas (SOUZA; LORENZI, 2012).

O gênero *Alternanthera* pertencente à tribo *Gomphrineae*, é composto por 80 espécies, sendo que 30 delas podem ser encontradas no Brasil (SIQUEIRA, 1995).

Algumas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular devido à atividade terapêutica proporcionada por compostos bioativos. Hundiwale et al. (2012) descrevem as espécies do gênero *Alternanthera* como produtoras e acumuladoras de metabólitos secundários, dentre eles, flavonoides, saponinas, vitaminas e glicosídeos.

Brochado et al. (2003) verificaram a presença de seis flavonoides inéditos em espécies do gênero *Alternanthera*, dentre eles Kaempferol e quercetina, sendo que Kaempferol 3-*O*-robinobiosídeo e kaempferol 3-*O*-rutinosídeo foram os derivados que apresentaram ação mais eficiente na inibição proliferativa de linfócitos humanos *in vitro*.

Estudos etnofarmacológicos relataram a atividade anti-viral, anti-microbiana, hepatoprotetora, anti-fúngica, anti-diarreica e analgésica de extratos de plantas desse gênero, como *Alternanthera brasiliiana*, *A. philoxeroides*, *A. sessilis* e *A. tenella* (FERREIRA et al., 2003). Estudos têm sido realizados comprovando a atividade anti-viral de extratos de *Alternanthera* spp. contra o vírus da imunodeficiência (HIV) e o vírus da herpes simples (HSV) (SI-MAN et al., 1988; LAGROTA et al., 1994).

1.3 *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze

Alternanthera brasiliiana (L.) Kuntze, é uma planta nativa do Brasil e conhecida popularmente como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho (MACEDO et al., 1999). Possui porte herbáceo, com altura entre 60-120 cm, folhas simples e opostas, verdes ou de

tons arroxeados, possui haste circular a poligonal em corte transversal, com longos entrenós. Apresenta flores brancas ou amareladas, dispostas em inflorescências do tipo glómulo, compostas por flores hermafroditas, actinomorfas e monocíclicas (MARONI et al., 2006). Duarte e Debur (2004) contribuíram com uma extensa descrição das características vegetativas anatômicas e morfológicas da espécie relatada em seu trabalho.

É classificada como vegetação de dunas internas e planícies, ocorrendo em dunas móveis, semifixas e fixas, planícies arenosas próximas à praia ou junto com dunas e lagunas. Assim é considerada tolerante à salinidade e com potencial para ser utilizada em regiões de solos salinos (Resolução 261-CONAMA, 1999).

Amplamente encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PEREIRA et al., 2007), é cultivada como ornamental pelo colorido arroxeado de suas folhas e empregada na medicina popular (LORENZI; MATOS, 2008). Suas inflorescências são utilizadas para dores de cabeça, resfriados e gripes, as folhas como antitérmico e as raízes contra diarreia (AGRA et al., 2007).

Em trabalho realizado por Souza et al., (1998) o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *A. brasiliiana* demonstrou-se muitas vezes mais potente do que as substâncias padrão aspirina, indometacina e dipirona, sendo o efeito analgésico dose dependente. Os autores sugerem que a presença de esteroides, terpenos e compostos fenólicos pode estar relacionada com a atividade analgésica dessa planta.

A aplicação de pomadas feitas a partir do extrato etanólico de *A. brasiliiana* proporcionou resultados eficazes na cicatrização de feridas em ratos imunocomprometidos (BARUA et al., 2012). Também já foi observada a atividade antimicrobiana moderada do extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Prototheca zopffi* (PEREIRA et al., 2007).

Macedo et al., (1999) observaram que os extratos obtidos de calos crescidos em meio contendo altas concentrações de regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) apresentaram efeito analgésico muito mais eficaz que o extrato da planta.

1.4 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa é uma importante ferramenta no melhoramento de espécies vegetais e vem sendo amplamente utilizada, visando melhorar e manter variedades de

importância econômica e medicinal (EHLERT et al., 2004). Esta forma de propagação reproduz as características da planta mãe e mantém a uniformidade nas populações, também possibilitando um rápido aumento no número de plantas a partir de uma planta matriz (HARTMANN et al., 2002).

Existem várias formas de propagação vegetativa, dentre elas o enraizamento de estacas, a enxertia, a apomixia, e a micropropagação. Estes tipos de reprodução são importantes do ponto de vista comercial, propagando plantas uniformes quanto ao seu genótipo e altamente selecionadas para características desejadas, tais como alta produção e resistência à doenças (CID; TEIXEIRA, 2010).

O enraizamento de estacas é um método onde se induz a formação de raízes adventícias em segmentos retirados da planta-mãe que, submetidos às condições favoráveis, originam uma nova planta (FACHINELLO et al., 2005). Através desta técnica podem ser utilizados órgãos vegetativos como os caules, rizomas, tubérculos, bulbos, folhas ou raízes, entretanto a capacidade de uma estaca emitir raízes depende de alguns fatores exógenos tais como temperatura, luminosidade, umidade e substrato e fatores endógenos como o potencial genético de enraizamento, idade da planta, época do ano e condição fisiológica da planta-matriz (HARTMANN et al., 2002).

Para Blazich (1988) os nutrientes presentes no substrato como nitrogênio, fósforo, zinco, potássio, cálcio e boro influenciam na resposta ao enraizamento, estando estes envolvidos nos processos metabólicos, proporcionando a desdiferenciação e formação de meristemas radiculares. O potencial de enraizamento em estacas caulinares também pode diferir conforme a porção do ramo utilizada e isso se deve à variação do conteúdo de carboidratos e substâncias ao longo do ramo que promovem ou inibem o crescimento. Muitos estudos com estacas têm utilizado diferentes porções do ramo como variável (FACHINELLO et al., 1994). Em trabalhos realizados com *Passiflora alata* (Dryand.), espécie herbácea da família Passifloraceae e *Lippia sidoides* Cham., espécie medicinal de porte arbustivo da família Verbenaceae, as estacas da posição apical apresentaram resultado superior às estacas da posição mediana e basal quanto ao enraizamento (Salomão et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto estacas apicais e basais são recomendadas para a propagação vegetativa da espécie subarbustiva *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (TAVARES et al., 2012). Hansen et al. (1978) relatam que diferentes respostas no enraizamento, entre as espécies, são possivelmente explicados por interações entre auxinas e carboidratos. Em alguns casos para que ocorra a iniciação radicular, é necessário um balanço hormonal, sendo a necessidade de indução externa variável. Para Hartmann et al. (2002) o Ácido indolbutírico (AIB) e o Ácido

naftalenoacético (ANA) são as auxinas mais utilizadas no tratamento das estacas. Muitas estacas herbáceas, tratadas com reguladores de crescimento como o AIB, demonstram um acréscimo no número de raízes (HARTMANN et al., 2002). Este resultado foi observado por Yamamoto et al. (2010) em *Psidium guajava* L., espécie de porte arbóreo da família Myrtaceae, onde as estacas herbáceas tratadas com AIB apresentaram a maior porcentagem de enraizamento, maior número de raízes por estaca e maior comprimento de raiz.

Estacas herbáceas de *Lavandula dentata* (Lamiaceae), submetidas a tratamento com AIB apresentaram os melhores resultados para a porcentagem de enraizamento (BONA et al., 2010). Entretanto algumas espécies não necessitam de indução externa, possuindo quantidade de auxinas endógenas suficiente para a indução do enraizamento adventício. Como ocorreu em *Rhododendron simsii* Planch. (Ericaceae), as estacas herbáceas medianas expostas ao tratamento com AIB não apresentaram diferença das estacas submetidas a tratamento sem o fitorregulador quanto ao enraizamento (LONE et al., 2010).

Outra forma de propagação vegetativa muito utilizada é a micropropagação de plantas, essa é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos e baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, em 1902, no qual uma célula vegetal possui potencial genético para regenerar uma planta inteira (TORRES et al., 1998).

A cultura de tecidos tem auxiliado o cultivo de plantas medicinais, proporcionando a obtenção de plantas homogêneas e de qualidade, gerando novas demandas por genótipos, rápida multiplicação clonal, plantas livres de doenças e independentes dos fatores sazonais (RAO; RAVISHANKAR, 2002; CID; TEIXEIRA, 2010).

O cultivo *in vitro* pode ser utilizado para a obtenção de compostos bioativos presentes nas plantas e de interesse farmacêutico. Em alguns casos, a maior produção de determinado metabólito secundário ocorre em plantas micropropagadas em relação à planta matriz (YOSHIMATSU et al., 1994). De acordo com os autores, o maior teor de emetina (1,8%) foi verificado nas raízes de plantas de *Cephaelis ipecacuanha* propagadas através da cultura de tecidos.

Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (DEBERGH; READ, 1991). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), diversos tipos de explantes podem ser utilizados na propagação *in vitro* de uma planta, mas para fazer seleção desses, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. O uso de segmentos nodais de origem basal e apical sem prévia subdivisão como variável em estudos de

multiplicação *in vitro*, pode provocar uma fonte de variação na resposta final para as espécies vegetais (PEREIRA; FORTES, 1999).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de fitorreguladores (SKOOG; MILLER, 1957). As citocininas são indispensáveis para a superação de dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares, já a suplementação de auxinas é usual para estimular o enraizamento e crescimento das partes aéreas, quando associada a uma citocinina, entretanto, a definição do tipo e da concentração adequada de citocinina e auxina para a regeneração *in vitro* requerem experimentos que testem combinações entre eles ajustando um meio de cultura adequado para cada espécie. Algumas espécies vegetais regeneram planta completa *in vitro* com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelos elevados níveis endógenos desses fitohormônios no explante utilizado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O uso de citocinina em excesso pode reduzir o tamanho das folhas, encurtar os entrenós, engrossar exageradamente os caules e promover a vitrificação generalizada, ocasionando problemas na fase de enraizamento (LESHEM et al., 1988). O uso excessivo de auxina pode inibir as brotações e favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo em detrimento da multiplicação (HU; WANG, 1983).

Ghosh e Sen (1994) obtiveram melhor regeneração *in vitro* de brotos de *Asparagus cooperi*, (Asparagaceae), utilizando explantes apicais cultivados em meio MS com a adição de 2,0 mg L⁻¹ de Benzilaminopurina (BAP) e 0,02 mg L⁻¹ de Ácido naftalenoacético (ANA). Trabalho realizado por Rodrigues (2010) relata que o uso da citocinina (BAP), em concentrações de (1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15 mg L⁻¹), em segmentos nodais de *Alternanthera brasiliana* cultivados em meio MS *in vitro* proporcionaram um decréscimo na variáveis número de folhas, raízes, altura da parte aérea e comprimento radicular, comparado aos segmentos nodais cultivados no mesmo meio desprovido de fitorreguladores.

1.5 Potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico

Desde a antiguidade a utilização de chás medicinais é uma prática comum no tratamento de doenças, mas muitas vezes estes são comercializados no mercado e administrados sem restrições ou informações de contra indicação, no entanto, a ingestão

destes deve ser monitorada, sendo necessário conhecer os seus efeitos colaterais especialmente sobre o material genético em organismos vivos (BAGATINI et al., 2007).

Considerando-se as diferentes técnicas utilizadas para investigar toxicidade em extratos vegetais, os bioensaios citogenéticos são uma ferramenta importante para identificar os efeitos de substâncias na estrutura dos cromossomos e também no ciclo celular, observando o índice mitótico, utilizado como indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002).

Entre as várias metodologias disponíveis, testes que utilizam as raízes das plantas são extremamente úteis nos ensaios biológicos e são relativamente baratos, além de apresentarem boa correlação com os sistemas teste em mamíferos (FISKESJÖ, 1985). Dentre estes métodos destaca-se o teste *Allium cepa* (cebola), no qual os bulbos são colocados em água destilada para enraizamento e após, as raízes são imersas durante 24 horas nas substâncias ou extratos a serem testados. Assim podem ser avaliados, nas células do meristema radicular principalmente o índice mitótico e o potencial anti-proliferativo, que informam sobre a capacidade de uma substância inibir a proliferação de células cancerígenas. Além disso, avalia o potencial anti-mutagênico, que é a capacidade de uma substância inibir a ação de mutagênicos e o potencial genotóxico, capacidade de uma substância causar alterações cromossômicas (FISKESJÖ, 1985; LUBINI et al., 2008).

As alterações podem ser de origem clastogênica, caracterizadas por quebras cromossômicas, e aneugênica oriundas de alterações nas estruturas citoplasmáticas celulares como o fuso mitótico (FENECH, 2000).

O teste *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (SILVA et al., 2004). A avaliação da genotoxicidade de muitas espécies já foi feita através deste teste, dentre elas estão *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw., *Cymbopogon citratus* (DC); *Lantana camara* L. e *Lippia alba* (Mill.); *Achyrocline satureioides* DC; *Urginea maritima* (L.) Baker; *Psychotria myriantha* Mull. Arg. e *P. leiocarpa* Cham., respectivamente (MARCIGLIA et al., 2011; SOUSA et al., 2010; SOUSA et al., 2009; FACHINETTO et al., 2007; METIN; BÜRÜN, 2010 e LUBINI et al., 2008).

2 REFERÊNCIAS

AGRA, A. M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 111, p. 383–395, 2007.

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

BARUA, C.C. et al. Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on Altered Antioxidant Enzyme Profile during Cutaneous Wound Healing in Immunocompromised Rats. **ISRN Pharmacology**, 8 p. 2012.

BLAZICH, F. A. Mineral nutrition and adventitious rooting. In: DAVIS, T.; HAISSIG B.E.; SANKHLA, N. Adventitious Rooting Formation in Cuttings. **Advances in Plant Sciences**, v. 2. Dioscorides Press, Portland, OR, p. 61–69, 1988.

BONA, C. M. et al. Adventitious rooting of auxin-treated *Lavandula dentata* cuttings. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1210-1213, 2010.

BROCHADO, C. O. et al. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *In Vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.

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.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-ERGB, 2010. p. 15-49.

ÇELIK, T. A.; ASLANTÜRK, Ö. S. Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. **Biologia, Bratislava**, v. 61, p. 693—697, 2006.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Characters of the leaf and stem morpho-anatomy of *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze, Amaranthaceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 1, jan./mar. 2004.

EHLERT, P. A. D. et al. Propagação vegetativa da alfavaca cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.10-13, 2004.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: ed. UFPEL, 1994. 179p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTGAL, J. C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Pelotas: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 69-109. 2005.

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**, v. 17, p. 49-54, Jan./Mar. 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, E.A. et al. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV- *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. Viçosa-MG. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.263-271, 2003.

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

GADANO, A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, p. 11-16, 2002.

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

GHOSH, B; SEN, S. Micropropagation of *Asparagus cooperi* as affected by growth regulators. **Biologia Plantarum**, v. 36, p. 527-532, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HANSEN, J.; STRONQUIST, L. H.; ERICSSON, A. Influence of irradiance on carbohydrate content and rooting of cuttings of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). **Plant Physiology**. v.61, n.6, p. 975- 979, 1978.

HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704 -1712, 2003.

HE, X.; LIN, L.; LIAN, L. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 755, p. 127-132, 1996.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York, Mac-Millan, 1983.v. 1, p. 117-227.

HUNDIWALE, J. C. et al. A current update on phytopharmacology of the genus *Alternanthera*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, p. 1924 -1929, 2012.

LAGROTA, M. M. C. et al. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the Herpes Simplex Virus. [Phytotherapy Research](#), v. 8, p. 358-361. 1994.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271- 276, 1988.

LONE, A. B. et al. Enraizamento de estacas de azaleia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, ago, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. ed. 2, Ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

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

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIBEL, M. A. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v. 54, n.10, p. 776-777, 1999.

MARCHIORETTO, M. S.; AZEVEDO, F.; JOSENDE, M. V. F.; SCHNORR, D. M. Biogeografia da família Amaranthaceae no Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica**, n. 59, p.171-190, 2008.

MARSIGLIA, J. D. C. et al. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza Online** p. 30- 34, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 23, p. 429-438, 2002.

METIN, M.; BÜRÜN, B. Effects of the high doses of *Urginea maritima* (L.) Baker extract on chromosomes. **Caryologia**, v. 63, n. 4, p. 367-375, 2010.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos In: SIMÕES, O. M. C. et al. **Farmacognosia da planta medicamento**. ed. UFRGS. 1999.

OLIVEIRA, G. L.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A. Enraizamento de estacas de *Lippia sidoides* Cham. utilizando diferentes tipos de estacas, substratos e concentrações do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu-SP, v.10, n.4, p.12-17, 2008.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana***. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Efeito do uso de segmentos basais e apicais na multiplicação *in vitro* da macieira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 1999.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101–153, 2002.

RESOLUÇÃO 261, Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, 1999.

RODRIGUES, I. C. S. **Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro***. 2010. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas, 2010.

SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, W. E.; DUARTE, R. C. C.; SIQUEIRA, D. L. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 1, p. 163-167, abril, 2002.

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.

SI-MAN, Z. et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medical Journal**, v.101, p. 816-866. 1988.

SIQUEIRA, J. C. Phytogeography of brazilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica**, v. 01, p. 5-21, 1994/1995.

SKOOG, F.; MILLER, F. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "*in vitro*". **Symposium Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; CAMPOS, J. M. S. LYDERSON, F. V. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; LYDERSON, F. V. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 305-311, 2010.

SOUZA, M. M.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL- FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 279–281. 1998.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática** : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3. ed. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

TAVARES, I. B. et al. Tipos de estacas e diferentes substratos na propagação vegetativa da erva cidreira (Quimiotipos I, II e III). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 206-213, Mar./Abr. 2012.

TEIXEIRA, R. O.; MARJORI, L. C.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E .P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551- 555, 2003.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 11-20.

VARANDA, E.; MONTI, R.; TAVARES, D. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 19, p. 403-413, 1999.

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**, v. 23, p. 593-598. 2001.

YAMAMOTO, L. Y. et al. Enraizamento de estacas de *Psidium guajava* L. 'Século XXI' tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco e álcool. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, mai, 2010.

YOSHIMATSU, K.; KAIO, K.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, n. 1, p. 22-25, 1994.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. Chapecó- SC: ed. Argos, UNOESC, 2001. 500p.

CAPITULO II

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *ex vitro* E *in vitro* DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE

RESUMO

O presente estudo visou a propagação vegetativa *ex vitro* e *in vitro* de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. Para a propagação via estaquia *ex vitro* foram utilizadas estacas apicais, medianas e basais, o substrato utilizado foi Água e MS 20% com ácido indol-butírico (AIB) (0,0 e 2,5 mg L⁻¹ em fluxo de 15 dias). A partir das variáveis avaliadas observa-se que os três tipos de estacas podem ser utilizadas na propagação por estaquia, apresentando porcentagem de enraizamento e sobrevivência acima de 62%. As estacas enraizadas foram transplantadas para recipientes contendo substrato (Plantmax) e vermiculita (3:1), e após 27 dias foram avaliadas através do desenvolvimento das plantas. Em geral, plantas provenientes de estacas medianas e basais apresentaram melhores resultados que as apicais, sugerindo que estas seriam as mais adequadas na produção de mudas. Na micropropagação foram utilizados segmentos apicais e nodais cultivados em meio MS acrescido de combinações de ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 e 0,05 mg L⁻¹) e benzil aminopurina (BAP) (0,0 e 0,5 mg L⁻¹). Para todas as variáveis analisadas os segmentos apicais apresentaram resultados superiores aos segmentos nodais, inclusive a porcentagem de regeneração que foi de 39,66% em segmentos apicais, a combinação dos fitoreguladores ANA e BAP não influenciou significativamente em nenhuma das variáveis. As plantas regeneradas *in vitro* foram transferidas para recipientes com substrato Plantmax e vermiculita (3:1), após 60 dias, foi observado que para a maior parte das variáveis não ocorreu diferença entre os tratamentos, sendo que a porcentagem de sobrevivência máxima (72,57%) ocorreu em plantas provenientes de segmentos apicais com meio acrescido de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Palavras-chave: Micropropagação. Estaquia. Penicilina.

1 INTRODUÇÃO

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze é uma espécie medicinal pertencente à família Amaranthaceae e conhecida como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho. Suas inflorescências são utilizadas para dores de cabeça, resfriados e gripes, as folhas como antitérmico e as raízes contra diarreia (AGRA et al., 2007). Estudos químicos revelaram a presença de 6 flavonoides *O*- glicosilados, dentre estes metabólitos inéditos no gênero

Alternanthera destacam-se Kaempferol 3-*O*-robinobioside e Kaempferol 3-*O*-rutinoside responsáveis pela atividade antiproliferativa de linfócitos (BROCHADO et al., 2003). Há ainda comprovações de que o extrato das folhas de *Alternanthera brasiliana* apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante (DELAPORTE et al., 2001; BARUA et al., 2012).

Estudos envolvendo a domesticação de plantas medicinais são escassos, sendo essenciais os que buscam a propagação de mudas uniformes e de qualidade, que se adaptem aos ambientes de cultivo e visem também a reposição no ambiente e a extração de seus princípios bioativos, utilizados pela indústria farmacêutica para a obtenção de novos fármacos.

Existem duas formas de reprodução, sexuada, através da germinação de sementes e vegetativa, através da utilização de partes da planta como caules, rizomas, tubérculos, bulbos, folhas ou raízes para formar uma nova planta. Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a estaquia destaca-se por ser a mais utilizada e por apresentar diversas vantagens como, procedimento simples, rápida e de baixo custo, reduzindo o período juvenil e produzindo um grande número de plantas com características genéticas idênticas às da mãe (HARTMANN; KESTER, 2002).

A propagação vegetativa também pode ser desenvolvida através de técnicas *in vitro*, como a micropropagação, produzindo plantas livres de patógenos e de rápida multiplicação em qualquer época do ano, devido às condições controladas de temperatura, luminosidade e suprimento de nutrientes dentro de um recipiente asséptico (HU; WANG, 1984).

No entanto a capacidade de regeneração das espécies através destes métodos é variável conforme alguns fatores endógenos e exógenos à planta, como o genótipo utilizado, o nível de carboidratos, fitohormônios e nutrientes minerais ao longo do ramo da planta matriz e as condições ambientais e microambientais no frasco de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; NICOLOSO et al., 1999). O uso de segmentos nodais de origem apical e basal para a obtenção de plantas homogêneas pode acarretar diferenças na resposta final devido à variação de substâncias existentes ao longo do ramo da planta matriz.

Assim, o estudo teve como objetivo a obtenção de plantas homogêneas de *Alternanthera brasiliana*, através das técnicas de enraizamento adventício de estacas aéreas *ex vitro* e micropropagação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de propagação vegetativa via enraizamento de estacas *ex vitro* e micropropagação foram conduzidos no período de janeiro a março de 2012 e de março a maio de 2012 respectivamente, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Casa de Vegetação Climatizada, pertencentes ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria –RS.

2.1 Enraizamento de estacas

Foram utilizadas estacas semi-lenhosas de 12-15 cm de comprimento retiradas da parte apical, mediana e basal de ramos com 70 a 120 cm de comprimento, provenientes de plantas matrizes existentes no Campus da UFSM.

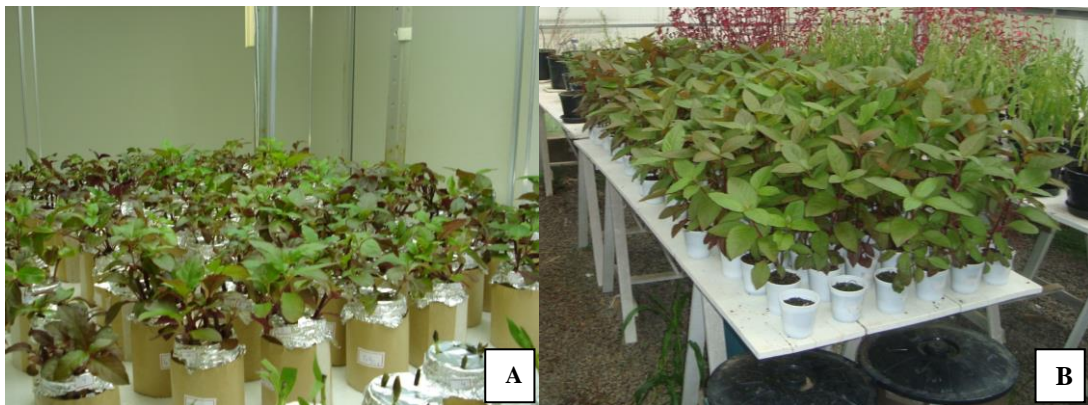
Os ramos coletados passaram por lavagem em água corrente e os cortes foram feitos com imersão em água destilada para evitar a cavitação nos tecidos. O excesso de folhas presente nas estacas foi retirado, permanecendo apenas duas folhas nas apicais e duas cortadas ao meio nas medianas e basais, a fim de mais ou menos padronizar a área foliar existente. Para desinfestação superficial as estacas foram imersas em recipiente com solução de água destilada acrescida de 10 gotas de hipoclorito de sódio 11% por litro de água seguida de outra lavagem em água destilada.

Os tratamentos foram constituídos por um trifatorial 3x2x2 estacas apicais, medianas e basais; duas concentrações de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) como substrato líquido (Água e MS 20%) e duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0 e 2,5 mg L⁻¹) fluxo de 15 dias. Para desinfecção dos tecidos, em todas as soluções foi acrescido 1 mL L⁻¹ de fungicida Bendazol e o pH foi regulado a $\pm 5,8$ utilizando NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. O meio líquido foi substituído por um novo semanalmente a fim de renovar a oxigenação e manter o pH regulado.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições e oito estacas por repetição. As estacas foram colocadas em recipientes de vidro, envolvidos com papel pardo, contendo 200 mL de solução nutritiva, fixadas com papel alumínio ao topo do recipiente e mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25° C \pm 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas

fluorescentes branca-frias (Figura 1A). Aos 21 dias após o início do experimento foi obtida para cada tratamento a porcentagem de estacas enraizadas, a porcentagem de sobrevivência, o número de raízes, o comprimento da maior raiz, o número de folhas novas emitidas e a massa fresca total das estacas.

Após o enraizamento das estacas, estas foram transferidas para vasos de polietileno de 400 mL, tendo como substrato Plantmax e vermiculita na proporção 3:1 e mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 1B). Após 27 dias, foi avaliada em cada estaca a altura da parte aérea, o número de folhas, o comprimento da maior raiz (cm), a área foliar (cm^2) através do integrador de área foliar portátil modelo AM 300 (ADC BioScientific, Inglaterra) e a massa fresca e massa seca das folhas, raízes e caule (g) através de secagem em estufa a 60°C .



Figuras 1 - Vista geral de estacas e plantas enraizadas de *Alternanthera brasiliana* mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $35 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias durante 21 dias (A) e em casa de vegetação com temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 27 dias (B), respectivamente.

2.2 Micropropagação

Foram utilizados como explantes segmentos apicais e nodais, com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidas de plantas cultivadas durante oito meses em casa de vegetação climatizada a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Durante dois meses antes da instalação do experimento as plantas matrizes foram pulverizadas a cada 20 dias com 1 mL L^{-1} de fungicida Bendazol (Carbendazim 500 mg L^{-1}) dissolvido em um litro de água destilada.

Para a desinfestação, os ramos aéreos coletados foram lavados em água corrente e água destilada. Em câmara de fluxo laminar os segmentos foram imersos em etanol 70% por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 2,0% durante 10 minutos, seguido de três lavagens em água destilada esterilizada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) semi-sólido com 6,0 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 1 mL L⁻¹ de fungicida Bendazol e o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes da inclusão do ágar e da autoclavagem (1atm, 120°C, 20 min).

Os meios foram acrescidos das combinações de Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,5 mg L⁻¹) e Ácido naftalenoacético (ANA) (0,0; 0,05 mg L⁻¹), respectivamente. Os tubos foram fechados com papel alumínio e as culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 35 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos arranjos num fatorial 2 X 2 (tipos de explantes e combinações de fitorreguladores), seis repetições por tratamento e 25 explantes por repetição, totalizando 150 explantes por tratamento.

Após 15 e 28 dias da inoculação foram avaliados o número de folhas, número de brotações aéreas, altura da parte aérea, número de raízes, porcentagem de enraizamento, contaminação fúngica e contaminação bacteriana, e apenas aos 28 dias a porcentagem de plantas completas regeneradas (parte aérea e raízes) e a porcentagem de explantes sem resposta.

As plantas regeneradas *in vitro* foram aclimatizadas em vasos de polietileno de 400 mL, tendo como substrato Plantmax e vermiculita na proporção 3:1 e mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições descritas acima. As plantas foram cobertas por um copo transparente de 500 mL com quatro furos de 1 cm de diâmetro cada e retirados ao longo da aclimatização.

Aos 60 dias foi avaliado o número de folhas, o número de brotações novas, a altura da parte aérea (cm), o comprimento da maior raiz (cm), a massa fresca da parte aérea e das raízes (g), a área foliar (cm²) utilizando o integrador de área foliar portátil modelo AM 300 (ADC BioScientific, Inglaterra) e a porcentagem de sobrevivência.

2.3 Análise Estatística

Para o enraizamento de estacas e micropropagação *in vitro* a análise estatística foi realizada utilizando o software SOC (EMBRAPA, 1997). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a análise complementar foi através do teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro, sendo transformados quando necessário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Enraizamento de Estacas

Verificou-se através do resumo da análise de variância (Tabela 1) a interação tripla entre os fatores tipo de estaca, tipo de substrato e concentração de fitorregulador para as variáveis, porcentagem de enraizamento, porcentagem de sobrevivência, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas novas emitidas e massa fresca total da estaca. Assim, para estas seis variáveis foram realizados os desdobramentos que contemplem esta interação.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância das variáveis: Comprimento da maior raiz (CMR), Número de Raízes (NR), Número de Folhas (NF), Massa Fresca Total (MFT), porcentagem de enraizamento (E) e porcentagem de sobrevivência (S) entre os fatores Tipos de estacas (TE), Tipos de solução nutritiva (TSN) e Concentrações de fitorregulador (CF) em estacas de *Alternanthera brasiliana*. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	QUADRADO MÉDIO						
	GL	CMR	NR	NF	MFT	(%) E	(%) S
TE	2	31.13*	213.5*	140.84*	10.06*	1927.08*	1927.08*
TSN	1	0.4	79.13	20.81*	1.06*	4.34	0.000
CF	1	57.28*	1655.47*	0.07	1.36*	39.06	69.44
TE x TSN	2	2.31	102.65	3.38	0.34	121.52	52.08
TE x CF	2	1.49	59.97	7.9	0.2	52.08	17.36
TSN x CF	1	24.44*	387.59*	39.32*	0.01	1254.34*	1111.11*
TE x TSN x CF	2	11.95*	485.32*	13.41*	1.42*	902.77*	746.52*
Resíduo	24	1.39	55.49	3.04	0.15	182.29	164.93
CV(%)		21.29	28.82	20.23	13.91	14.89	14.01

*- F Significativo a 5% de probabilidade

Na tabela 2 encontram-se os resultados para porcentagem de enraizamento e de sobrevivência das estacas apicais, medianas e basais submetidas aos tratamentos.

Observa-se que independente dos tratamentos, as porcentagens de estacas enraizadas foram altas, sendo que a maioria atingiu 100%, não diferindo das demais estatisticamente, com exceção do tratamento constituído pelas estacas apicais submetidas ao substrato água com 2,5 mg L⁻¹ de AIB (58,3%). Estes resultados sugerem que a utilização do fitorregulador AIB pode influenciar de forma negativa apenas as estacas apicais, possivelmente pela maior concentração endógena desta auxina no ápice dos ramos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Outras espécies herbáceas também apresentaram bons resultados na porcentagem de enraizamento de estacas apicais, medianas e basais, sem a utilização de fitorregulador, entre elas estão *Pfaffia glomerata* com valores acima de 75%, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit entre 86% e 100% e estacas apicais de *Lippia sidoides* com 98% (NICOLOSO et al., 1999; MAIA et al., 2008; JUNIOR et al., 2009, respectivamente).

O melhor tipo de estaca a ser utilizada é um fator variável conforme a espécie, considerando que vários trabalhos divergem quanto à parte do ramo mais apropriada para o

enraizamento das mesmas (EHLERT et al., 2004; BASTOS et al., 2004; BONA et al., 2005; LUSA; BIASI, 2011).

As maiores porcentagens de sobrevivência foram de 87,5% a 100%, independente do tipo de estaca. Apenas as estacas apicais do substrato água com 2,5 mg L⁻¹ de AIB e do substrato com 20% dos sais do meio MS e sem AIB apresentaram as menores porcentagens de sobrevivência, ambas com 62,5%.

Tabela 2 – Porcentagem de enraizamento e sobrevivência das estacas apicais, medianas e basais de ramos aéreos de *Alternanthera brasiliana* submetidas aos tratamentos, Santa Maria-RS, 2012.

TRATAMENTOS	(% ENRAIZAMENTO)			(% SOBREVIVÊNCIA)		
	TIPOS DE ESTACAS					
	APICAL	MEDIANA	BASAL	APICAL	MEDIANA	BASAL
MS 0%+ AIB 0,0 mg L ⁻¹	87.50 a	100.0 a	100.0 a	87.50 a	100.0 a	100.0 a
MS 0% + AIB 2,5 mg L ⁻¹	58.3 b	100.0 a	100.0 a	62.50 a	100.0 a	100.0 a
MS 20% + AIB 0,0 mg L ⁻¹	62.50 a	100.0 a	87.50 a	62.50 a	100.0 a	91.66 a
MS 20% + AIB 2,5 mg L ⁻¹	95.83 a	95.83 a	100.0 a	95.83 a	100.0 a	100.0 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962).

AIB: ácido indolbutírico

A tabela 3 mostra a influencia do uso de 2,5 mg L⁻¹ de AIB às soluções nutritivas sobre cada tipo de estaca para as variáveis número de raízes e comprimento da maior raiz. Para a variável número de raízes, estacas apicais mantidas em solução nutritiva contendo 20% dos sais MS e 2,5 mg L⁻¹ de AIB apresentaram o maior número de raízes (44,45), diferindo significativamente apenas quando cultivadas em substrato sem AIB com médias de 7,29. Estes resultados sugerem que a suplementação de nutrientes e de AIB ao substrato induzem maior número de raízes em estacas apicais de *Alternanthera brasiliana*. No caso das medianas e basais a adição de 20% dos sais minerais MS e do fitorregulador AIB no substrato não influenciaram na indução radicial, visto que não foram observadas diferenças significativas no número de raízes entre os tratamentos.

Blazich (1988) cita que os nutrientes presentes no meio (substrato) como nitrogênio, fósforo, zinco, potássio, cálcio e boro influenciam na resposta ao enraizamento, estando estes envolvidos nos processos metabólicos, proporcionando a desdiferenciação e formação de

meristemas radiculares na base das estacas. No entanto a facilidade de enraizamento das estacas de *A. brasiliiana* pode estar associada à maior concentração de carboidratos presentes nas porções do ramo estudadas. Possivelmente as estacas apicais apresentaram maior número de raízes, não apenas pela indução externa do AIB e da solução nutritiva, mas também devido à produção de auxinas no meristema apical do caule translocadas até a base das estacas pelas células do parênquima, onde induzem a formação radicial (Taiz e Zeiger, 2009), não necessitando, portanto, de indução externa.

Estacas medianas do substrato MS 20% e basais do substrato sem nutrientes, ambas sem a adição de AIB apresentaram médias de 8,31 e 8,47 cm para o comprimento da maior raiz, respectivamente, resposta significativamente superior às estacas medianas e basais nestes substratos com a adição de AIB 2,5 mg L⁻¹ (4,41 e 4,25 cm, respectivamente). Os tratamentos com estacas apicais submetidas ao meio sem nutrientes e sem AIB (água destilada) obtiveram média de 7,04 cm no comprimento da maior raiz, resultado superior ao das apicais com a presença de AIB com 1,52 cm.

Apesar do fluxo de AIB ter sido de 15 dias, este comportamento pode estar associado à capacidade da auxina induzir a formação de raízes, mas inibir o alongamento das mesmas (THIMANN, 1936; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Taiz e Zeiger (2009), quando as raízes são expostas a presença de auxina são desencadeados mecanismos que levam a produção de etileno, e este por sua vez promove a expansão lateral das células, inibindo o alongamento das raízes.

Na tabela 4 verifica-se o número de folhas novas e a massa fresca total de cada tipo de estaca, submetidas a substratos com e sem meio MS e AIB. Estacas medianas e basais de *A. brasiliiana* formaram as maiores médias no número de folhas novas entre 7,25 e 13,66. Este resultado corrobora com o obtido por Nicoloso et al. (1999) em estacas de consistência herbácea de *Pfaffia glomerata* (Spreng.), onde o número de folhas foi superior em estacas medianas e basais com relação às estacas da porção apical.

A maior formação de folhas nas estacas medianas e basais de *A. brasiliiana* possivelmente influenciou no maior enraizamento destas, facilitando o processo, pela translocação das auxinas produzidas nas folhas e gemas para a parte inferior da estaca, concentrando-se na base do corte juntamente com os açúcares, compostos nutricionais e fitohormonais auxiliando no enraizamento (NANDA et al., 1971; HARTMANN; KESTER, 1990; ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Bem como o número de folhas, a massa fresca total também foi maior em estacas medianas e basais com relação às apicais, com valores entre 2,91 a 4,32 g, independente do

uso de nutrientes e de AIB. Este resultado pode estar associado ao maior número de folhas presente nas estacas medianas e basais, como também, à massa das estacas no início do experimento, e não só às novas brotações e raízes que surgiram, portanto, estas apresentam maior diâmetro e conseqüentemente massa superior à das apicais. Salomão et al. (2002) também obtiveram resultados superiores de massa seca em estacas medianas e basais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* com relação às estacas apicais, com valores acima de 1,18 g.

Tabela 3 - Número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) em estacas apicais, medianas e basais de *Alternanthera brasiliana* submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%) e AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.

TRATAMENTOS	NR		CMR (cm)	
	CONCENTRAÇÃO DE AIB			
	AIB 0,0 mg L ⁻¹	AIB 2,5 mg L ⁻¹	AIB 0,0 mg L ⁻¹	AIB 2,5 mg L ⁻¹
APICAL + MS 0%	18.08 a	14.25 a	7.04 a	1.52 b
APICAL + MS 20%	7.29 b	44.45 a	2.52 a	3.64 a
MEDIANA + MS 0%	26.45 a	31.29 a	7.66 a	4.89 a
MEDIANA + MS 20%	22.79 a	34.83 a	8.31 a	4.41 b
BASAL + MS 0%	18.04 a	38.04 a	8.47 a	4.25 b
BASAL + MS 20%	21.70 a	32.87 a	6.77 a	6.91 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Número de folhas novas e massa fresca total de estacas apicais, medianas e basais de *Alternanthera brasiliana* submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%) e AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.

TRATAMENTOS	NFN			MFTE (g)		
	TIPO DE ESTACA					
	APICAL	MEDIANA	BASAL	APICAL	MEDIANA	BASAL
MS 0% + AIB 0,0 mg L ⁻¹	5.16 a	9.75 a	9.95 a	2.04 b	3.05 ab	3.23 a
MS 0% + AIB 2,5 mg L ⁻¹	4.62 b	13.12 a	13.66 a	1.47 b	3.81 a	4.32 a
MS 20% + AIB 0,0 mg L ⁻¹	4.87 b	12.58 a	9.12 ab	1.31 b	3.08 a	3.01 a
MS 20% + AIB 2,5 mg L ⁻¹	4.0 b	7.25 ab	9.33 a	2.26 a	2.91 a	3.3 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As estacas enraizadas foram transferidas para recipientes de plástico contendo substrato Plantmax e vermiculita na proporção 3:1, mantendo-se as origens das mesmas após a submissão aos tratamentos no processo de estaquia. Após 27 dias de cultivo em casa de vegetação, as mesmas foram avaliadas e o resumo da análise de variância encontra-se na tabela 5. Observa-se interação dupla entre os fatores tipo de estaca e concentração de fitorregulador e entre tipo de substrato e concentração de fitorregulador, para as variáveis, altura da parte aérea, número de folhas, massa fresca das raízes e massa seca das raízes. Assim, para estas quatro variáveis foram realizados os desdobramentos de modo a contemplar as interações existentes. Entretanto, embora tenha ocorrido efeito dos tratamentos nas variáveis, número de folhas e massa seca das raízes no teste F da análise de variância, não houve diferença significativa entre os tratamentos no teste de comparação das médias.

Para as variáveis, comprimento da maior raiz, área foliar e massa fresca e seca das folhas e do caule não ocorreu nenhum tipo de interação e efeito isolado dos fatores testados.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância das variáveis: Altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR), área foliar (AF), massa fresca das folhas (MFF), massa fresca das raízes (MFR), massa fresca do caule (MFC), massa seca das folhas (MSF), massa seca das raízes (MSR) e massa seca do caule (MSC) nos Tipos de estaca (TE), Tipos de solução nutritiva (TSN) e Concentrações de Fitorregulador AIB (CF) em plantas de *Alternanthera brasiliana* provenientes da propagação por estaquia. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	QUADRADO MÉDIO										
	GL	APA	NF	CMR	AF	MFF	MFR	MFC	MSF	MSR	MSC
TE	2	106*	110.18	2.35	12258.2	5.27	0.137	1.461	0.052	0.085	0.142
TSN	1	12.03	52.82	20.68	15187.8	1.64	2.160*	9.568	0.062	0.07	0.403
CF	1	77.62	44.2	22.36	2314.14	4.28	0.594	11.2	0.006	0.081	0.013
TE x TSN	2	149.55*	11.29	6.72	10835.6	1.23	1.836*	6.99	0.059	0.044	0.104
TE x CF	2	113.15*	174.08*	3.84	14255	4.96	4.673*	5.7	0.043	0.2*	0.012
TSN x CF	1	630.74*	1.41	7.07	20450.6	11.93	0.009	7.3	0.082	0.02	0.013
TE x TSN x CF	2	31.47	52.03	2.4	23005.9	11.14	0.49	6.08	0.086	0.19	0.106
Resíduo	24	31.07	44.36	8.37	15799.2	5.46	0.424	3.83	0.051	0.06	0.137
CV(%)		18.68	22.08	15.55	18.99	16.61	31.79	16.93	13.82	36.59	18.06

*- F Significativo a 5% de probabilidade

Os resultados dos efeitos do tipo de estaca e do substrato sobre a altura da parte aérea de plantas de *Alternanthera brasiliana* em casa de vegetação encontram-se na tabela 6, indicando que a solução contendo 20% dos sais MS não influenciou na altura da parte aérea das plantas provenientes de estacas apicais, medianas e basais com 28,51; 31,20 e 28,05 cm, respectivamente. Entretanto plantas provenientes de estacas apicais do substrato sem nutrientes MS apresentaram 25,02 cm de altura, diferindo das estacas basais com 37,33 cm de altura. Em trabalho realizado por Nicoloso et al. (1999) as mudas provenientes de estacas medianas e basais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen apresentaram maior altura e número de brotos que as provenientes de estacas apicais.

Tabela 6 - Altura da parte aérea de plantas de *A. brasiliana* provenientes de estacas apicais medianas e basais submetidas a tratamentos com solução nutritiva MS (0 e 20%). Santa Maria, RS, 2012.

TIPO DE ESTACA	ALTURA DA PARTE AÉREA	
	MS 0%	MS 20%
APICAL	25.02 b A	28.51 a A
MEDIANA	28.88 ab A	31.2 a A
BASAL	37.33 a A	28.05 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na tabela 7 verifica-se o efeito da concentração de AIB e do tipo de estaca sobre a massa fresca das raízes das plantas. Plantas provenientes de estacas apicais, medianas e basais, enraizadas em substrato sem AIB e apicais e basais com 2,5 mg L⁻¹ de AIB, apresentaram maior massa fresca das raízes com valores entre 1,58 g e 2,72 g, em relação as plantas provindas de estacas medianas com 2,5 mg L⁻¹ de AIB, com 1,16 g. Portanto, o uso do fitorregulador AIB no substrato das estacas medianas pode ter inibido o desenvolvimento das plantas, já em estacas apicais e basais de *A. brasiliana* o uso de AIB proporcionou maior massa de raízes e uniformidade no enraizamento das plantas.

Tabela 7 - Massa fresca das raízes de plantas de *A. brasiliana* provenientes de estacas apicais, medianas e basais submetidas a tratamentos com AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹) fluxo de 15 dias, acrescido ao substrato. Santa Maria, RS, 2012.

TIPO DE ESTACA	MASSA FRESCA DAS RAÍZES (g)	
	AIB 0,0 mg L ⁻¹	AIB 2,5 mg L ⁻¹
APICAL	2.22 a A	2.08 ab A
MEDIANA	2.72 a A	1.16 b B
BASAL	1.58 a A	2.51 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Micropropagação

Através dos resumos das análises de variância (Tabelas 8 e 9), pode ser observado, nas avaliações aos 15 e 28 dias, que não houve interação entre os fatores tipo de explante e combinação de fitorregulador para as variáveis, altura da parte aérea, número de raízes, porcentagem de plantas regeneradas, porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de contaminação bacteriana e explantes sem resposta (aos 28 dias), sendo as análises complementares realizadas para o efeito principal de cada fator. Ocorreu interação dupla entre os fatores tipo de explante e combinação de fitorreguladores na avaliação aos 15 dias para as variáveis, número de folhas e porcentagem de enraizamento, e a mesma interação aos 28 dias para a variável número de brotos. Assim as análises complementares para essas variáveis foram realizadas de modo a contemplar as interações existentes, as mais relevantes estão demonstradas em tabelas.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância das variáveis: Número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de contaminação fúngica (CF) e porcentagem de contaminação bacteriana (CB) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de Fitorreguladores (CF) em plantas de *Alternanthera brasiliana* micropropagadas *in vitro* aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	QUADRADO MÉDIO							
	GL	NF	NB	APA	NR	(%) E	(%) CF	(%) CB
TE	1	12.84*	0.56*	50.41*	0.7*	522.66*	6.01*	5.24*
CF	1	0.08	0	0.12	0.01	2.66	0.15	0.84
TE x CF	1	0.52*	0	0	0.2	130.66*	0.03	0.05
Resíduo	20	0.11	0	0.2	0.05	29.6	0.96	0.84
CV(%)		16.86	15.15	15.06	60.15	38.86	62.91	48.8

*- F Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 9 - Resumo da análise de variância das variáveis: Número de Folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fúngica (CF), porcentagem de contaminação bacteriana (CB) e explantes sem resposta (ESR) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de fitorreguladores (CF) em plantas de *Alternanthera brasiliana* micropropagadas *in vitro* aos 28 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	GL	QUADRADO MÉDIO								
		NF	NB	APA	NR	(%) E	(%) PR	(%) CF	(%) CB	(%) ESR
TE	1	13.68*	1.26*	51.36*	4.1*	3952.66*	3952.66*	0.95	12.64*	2816.66*
CF	1	0.1	0.44*	0.21	0.29	32.66	32.66	5.68*	3.98	16.66
TE x CF	1	0.01	0.27*	0.73	0.29	240.66	240.66	0.68	0.26	80.66
Resíduo	20	0.54	0.01	0.37	0.19	115.86	115.86	1.07	1.11	161.46
CV(%)		26.49	45.65	19.39	56.9	40.11	40.11	50.9	47.81	42.12

*- F Significativo a 5% de probabilidade

Aos 15 e 28 dias de cultivo *in vitro* os explantes obtidos através dos segmentos apicais apresentaram os melhores resultados em número de folhas (2,93 e 3,54), número de brotos (0,8 e 0,78), altura da parte aérea (4,45 e 4,60), número de raízes (0,54 e 1,19) e porcentagem de enraizamento (18,66 e 39,66%) (Tabela 10 e 11), respectivamente, valores significativamente superiores em relação aos explantes de origem nodal. Aos 28 dias avaliou-se a porcentagem de plantas completas regeneradas *in vitro*, ocorrendo 39,6% de regeneração nos explantes apicais, e nos nodais apenas 14,01% (Tabela 11), sugerindo que os explantes mais adequados para a micropropagação de *Alternanthera brasiliana* são os apicais.

A maior porcentagem de contaminação ocorreu em explantes do segmento nodal, com 7% de contaminação fúngica e 9,66% de contaminação bacteriana aos 28 dias (Tabela 11). Possivelmente o pré-tratamento com a aplicação de fungicida nas plantas matrizes, a desinfestação superficial e o uso de fungicida no meio de cultura contribuíram no controle da contaminação *in vitro*.

Os explantes nodais também foram os que resultaram na maior porcentagem de explantes sem resposta com 41% aos 28 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 11).

Tabela 10 - Efeito dos explantes apicais e nodais no número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de contaminação fúngica (CF) e porcentagem de contaminação bacteriana (CB) de *A. brasiliana* micropropagadas *in vitro* aos 15 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.

PLANTAS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> AOS 15 DIAS							
TIPO DE EXPLANTE	NF	NB	APA	NR	(%) E	(%) CF	(%) CB
APICAL	2.93 a	0.8 a	4.45 a	0.54 a	18.66 a	1.00 b	2.00 b
NODAL	1.17 b	0.49 b	1.55 b	0.20 b	9.33 b	5.00 a	6.00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11 - Efeito dos explantes apicais e nodais no número de folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de enraizamento (E), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fúngica (CF), porcentagem de contaminação bacteriana (CB) e porcentagem de explantes sem resposta (SR) de *A. brasiliana* micropropagadas *in vitro* aos 28 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2012.

PLANTAS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> AOS 28 DIAS									
TIPO DE EXPLANTE	NF	NB	APA	NR	(%) E	(%) PR	(%) CF	(%) CB	(%) ESR
APICAL	3.54 a	0.78 a	4.6 a	1.19 a	39.66 a	39.60 a	2.66 b	2.33 b	19.33 b
NODAL	2.03 b	0.29 b	1.67 b	0.36 b	14.00 b	14.01 b	7.00 a	9.66 a	41.00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A influência da posição dos explantes sobre o desenvolvimento das plantas regeneradas *in vitro* tem sido observada em outros estudos. Segundo Davies (1995) e Grattapaglia e Machado (1998), segmentos apicais estão sob efeito da dominância apical, enquanto que, em segmentos nodais é necessário um balanço auxina/citocinina para estimular o desenvolvimento.

As respostas diferenciadas, entre explantes apicais e nodais de uma mesma planta, também podem ser atribuídas aos diferentes níveis de fitohormônios endógenos presentes nas distintas porções da planta e ao grau de responsividade do genótipo utilizado (GHOSH; SEN, 1994; ROUT et al., 2000).

Segmentos nodais de outras espécies também regeneraram plantas *in vitro* sem a necessidade de fitorreguladores no meio de cultura, tais como a espécie arbustiva *Tournefortia cf paniculata* Cham. e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. acesso JB-UFSM (BERTOLUCCI et al, 2000; FLORES et al., 2009, respectivamente). Entretanto para a espécie trepadeira *Mikania glomerata* a dose de 0,5 mg L⁻¹ de BAP foi eficiente na indução de brotos em segmentos nodais (PEREIRA et al. 1999). A combinação de BAP 2,0 mg L⁻¹ e ANA 0,1 mg L⁻¹ no meio de cultura favoreceu a regeneração de plantas *in vitro*, chegando a 42%, a partir do cultivo *in vitro* de segmentos apicais e nodais da espécie arbustiva *Maytenus ilicifolia* Mart. (FLORES et al, 1998).

Na tabela 12 verificam-se as médias das variáveis, altura da parte aérea, número de raízes, porcentagem de plantas regeneradas, porcentagem de contaminação fúngica e contaminação bacteriana dos tratamentos com a combinação de ANA (0,0; 0,05 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 0,5 mg L⁻¹), avaliados aos 28 dias. Para estas variáveis os fitorreguladores não influenciaram na resposta, não diferindo dos tratamentos sem fitorreguladores.

Na tabela 13 verificam-se aos 15 dias as variáveis número de folhas e porcentagem de enraizamento, e aos 28 dias, a variável número de brotos, essas apresentaram interação entre a combinação de fitorreguladores e o tipo de explante, entretanto não houve efeito significativo do uso de ANA e BAP em relação aos explantes do meio desprovido deles no teste de comparação das médias. Esta indiferença poderia estar associada à baixa dosagem utilizada, não proporcionando o efeito estimulador suficiente aos explantes, no entanto, Rodrigues (2010) estudando a micropropagação de *A. brasiliana* verificou que o uso da citocinina BAP no meio MS com dosagens de (1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg L⁻¹) proporcionou decréscimo significativo no número de folhas, número de raízes, altura da parte aérea e comprimento radicular com relação aos segmentos nodais cultivados em meio MS sem BAP. A ineficiência da combinação de ANA e BAP utilizados também pode estar associada à ação adsorvente do carvão ativado sobre os fitorreguladores (MOHAMED – YASSEEN, 2001). No entanto, Johansson et al. (1990) consideram que o carvão ativado pode gradualmente libertar os produtos adsorvidos no meio, podendo estes serem utilizados pelo explante.

A dose utilizada de ANA 0,05 mg L⁻¹ no meio MS não induziu o enraizamento nos explantes de *A. brasiliana* em relação aos do meio sem o fitorregulador. Estes resultados podem ser justificados pelo acúmulo de auxinas endógenas provenientes principalmente de gemas (CARVALHO et al., 1999).

Tabela 12 - Altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), porcentagem de plantas regeneradas (PR), porcentagem de contaminação fungica (CF) e contaminação bacteriana (CB) aos 28 dias em explantes de *Alternanthera brasiliana* cultivados *in vitro* em meio MS com combinações de ANA (0,0 e 0,05 mg L⁻¹) e BAP (0,0 e 0,5 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.

CF	APA	NR	(%) PR	(%)CF	(%)CB
0,0 ANA + 0,0 BAP	3.24 a	0.89 a	28.00 a	2.66 a	4.33 a
0,05 ANA+ 0,5 BAP	3.05 a	0.67 a	25.66 a	7.00 a	7.66 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 – Número de folhas e porcentagem de enraizamento aos 15 dias de cultivo *in vitro*, e número de brotos aos 28 dias de cultivo *in vitro* em explantes apicais e nodais cultivados em meio MS contendo as combinações de ANA (0,0 e 0,05 mg L⁻¹) e BAP (0,0 e 0,5 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, 2012.

CF	15 DIAS				28 DIAS	
	NF		(%) E		NB	
	APICAL	NODAL	APICAL	NODAL	APICAL	NODAL
0,0 ANA + 0,0 BAP	2.93 a	1.17 a	21.33 a	7.33 a	0.78 a	0.1 a
0,05 ANA + 0,5 BAP	2.52 a	1.35 a	16 a	11.33 a	0.29 a	0.04 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após a micropropagação *in vitro* as plantas regeneradas foram transferidas para vasos de polietileno de 400 mL, tendo como substrato solo adubado (Plantmax) e vermiculita na proporção 3:1 e mantidas em sala de crescimento climatizada com as mesmas condições de luminosidade e temperatura da micropropagação, mantendo-se as origens das mesmas após a submissão aos tratamentos no processo de micropropagação. Após 60 dias de aclimatização os dados foram submetidos à análise de variância, que pode ser observada na tabela 14, onde se encontram a porcentagem de sobrevivência, número de folhas, número de brotos, altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, massa fresca da parte aérea e das raízes e área foliar. Houve interação dupla entre os fatores tipo de explante e combinação de fitorregulador, para as variáveis, altura da parte aérea e massa fresca da parte aérea, onde foram realizados os desdobramentos de modo a contemplar este tipo de interação (Tabela 15). Para área foliar não houve nenhum tipo de interação, assim as análises foram realizadas para o efeito principal de cada fator (Tabelas 16 e 17).

Tabela 14 - Resumo da análise de variância das variáveis: Número de Folhas (NF), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CMR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), área foliar (AF) e porcentagem de sobrevivência (S) nos Tipos de explante (TE) e Combinações de Fitorreguladores (CF) em plantas de *Alternanthera brasiliana* micropropagadas *in vitro* e aclimatizadas durante 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.

Fonte de Variação	QUADRADO MÉDIO								
	GL	(%) S	NF	NB	APA (cm)	CMR (cm)	MFPA (g)	MFR (g)	AF (cm ²)
TE	1	949.66	38.172	0.011	2.344	0.038	3.620*	0.014	6390.465*
CF	1	516.24	1.025	0.144	22.521	5.982	5.336*	0.001	5834.231*
TE X CF	1	159.59	2.123	0.015	53.739*	9.392	3.027*	0.002	1590.342
Resíduo	15	808.98	29.144	0.074	9.968	2.878	0.659	0.004	1046.609
CV (%)		48.15	30.56	23.21	16.07	35.36	27.68	69.79	29.67

*- F Significativo a 5% de probabilidade

Na tabela 15 pode ser observado que as plantas originadas a partir de explantes apicais na micropropagação, independente do uso de ANA e BAP no meio, e a partir de segmentos nodais mantidos em meio com fitorreguladores apresentaram os melhores resultados em altura da parte aérea e massa fresca da parte aérea com valores entre 22,98 e 19,72 cm e entre 3,57 e 3,03 g, respectivamente.

Estes resultados sugerem que as plantas provenientes de explantes apicais e nodais demonstram efeito residual da indução dos fitorreguladores presentes na fase de micropropagação *in vitro*, propiciando melhor resposta destas variáveis na aclimatização.

Tabela 15 - Efeito do tipo de explante (TE) (Apical e Nodal) e da combinação de fitorreguladores sobre a altura da parte aérea (APA) e massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de *Alternanthera brasiliana* provenientes da micropropagação *in vitro*, aclimatizadas durante 60 dias.

TIPO DE EXPLANTE	APA (cm)		MFPA (g)	
	0,0 ANA + 0,0 BAP mg L ⁻¹	0,05 ANA + 0,5 BAP mg L ⁻¹	0,0 ANA + 0,0 BAP mg L ⁻¹	0,05 ANA + 0,5 BAP mg L ⁻¹
APICAL	20.09 a A	19.72 a A	3.03 a A	3.49 a A
NODAL	16.33 a B	22.98 a A	1.45 b B	3.57 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas tabelas 16 e 17 encontram-se os resultados de área foliar para as plantas regeneradas *in vitro* aclimatizadas, mantendo-se a origem dos tratamentos. Observa-se que os explantes apicais e a combinação de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP proporcionaram os melhores resultados para área foliar, com 123,01 cm² (Tabela 16) e 128,76 cm² (Tabela 17), respectivamente. Considerando a inexistência de fontes de variação na aclimatização, onde foi utilizado o mesmo substrato, temperatura, luminosidade e suprimento hídrico para todas as plantas, estes resultados podem estar associados a maior capacidade de desenvolvimento das folhas em plantas originadas a partir dos segmentos apicais durante a micropropagação. O uso da combinação de ANA e BAP na micropropagação não apresentou efeito sobre os explantes, no entanto possivelmente ocorreu um efeito residual dos fitorreguladores nas plantas aclimatizadas.

Tabela 16 - Efeito do tipo de explante (TE) (Apical e Nodal) sobre a área foliar (cm²) de plantas de *Alternanthera brasiliana* provenientes da micropropagação *in vitro*, aclimatizadas durante 60 dias.

TE	ÁREA FOLIAR (cm ²)
APICAL	123.01 a
NODAL	84.99 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 17 - Efeito da combinação de fitorreguladores (CF) sobre a área foliar (cm^2) de mudas de *Alternanthera brasiliana* provenientes da micropropagação *in vitro*, aclimatizadas durante 60 dias.

CF	ÁREA FOLIAR (cm^2)
0,0 BAP + 0,0 ANA	91.21 b
0,5 BAP + 0,05 ANA	128.76 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na tabela 18 encontra-se a porcentagem de sobrevivência das plantas aclimatizadas em cada tratamento. Independente da origem das plantas micropropagadas a sobrevivência variou de 50,71 a 72,57 %. Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos as plantas provenientes de explantes apicais mantidos em meio com ANA 0,05 mg L^{-1} e BAP 0,5 mg L^{-1} apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência (72,57%), bem como para a variável área foliar esse resultado possivelmente está associado ao efeito residual dos fitorreguladores.

Tabela 18 - Efeito do tipo de segmento e da combinação de fitorreguladores (concentração em mg L^{-1}) sobre a porcentagem de sobrevivência de plantas de *Alternanthera brasiliana* provenientes da micropropagação *in vitro*, aclimatizadas durante 60 dias. Santa Maria, RS, 2012.

TRATAMENTO	(%) SOBREVIVÊNCIA
Apical (0,0 ANA + 0,0 BAP)	58.14 a
Nodal (0,0 ANA + 0,0 BAP)	50.71 a
Apical (0,05 ANA + 0,5 BAP)	72.57 a
Nodal (0,05 ANA + 0,5 BAP)	54.83 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

- Estacas medianas e basais apresentam melhores resultados no enraizamento e sobrevivência que estacas apicais de *Alternanthera brasiliana*, independente do uso de fitorregulador AIB e meio nutritivo MS;
- Segmento apical é o explante mais apropriado para a micropropagação de *A. brasiliana*, não havendo influência da combinação de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP na regeneração *in vitro* de explantes apicais e nodais de *A. brasiliana*;
- As plantas provenientes de segmentos apicais cultivados *in vitro* em meio MS acrescido de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP apresentam maior porcentagem de sobrevivência na aclimatização.

5 REFERÊNCIAS

- AGRA, A. M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 111, p. 383–395, 2007.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.
- BACARIN, M. A. et al. Características fotossintéticas de batata cv. Baronesa e seu genótipo transformado geneticamente para resistência ao PVY. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 383- 387, jul.- set., 2008.
- BARUA, C.C. et al. Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on Altered Antioxidant Enzyme Profile during Cutaneous Wound Healing in Immunocompromised Rats. **ISRN Pharmacology**, 8 p. 2012.
- BASTOS, D. C. et al. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas apicais e basais de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) sob condições de nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 26, n. 2, p. 284- 286, ago, 2004.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n.1, p. 43-49, 2000.

BLAZICH, F. A. Mineral nutrition and adventitious rooting. In: DAVIS, T.; HAISSIG B.E.; SANKHLA, N. Adventitious Rooting Formation in Cuttings. **Advances in Plant Sciences**, v. 2. Dioscorides Press, Portland, OR, p. 61–69, 1988.

BONA, C. M.; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. **Ciência Rural**, Santa Maria- RS, v. 35, n.1, p. 223- 226, jan-fev, 2005.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.25, p.2-10, 1996.

CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arábica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotécnica**, v. 23, n. 3, p. 483- 490, 1999.

COSTA, L.C.B., 1996. **Trocas gasosas, atividade da redutase do nitrato, composição química e estrutura anatômica em plantas de *Theobroma cacao* submetidas a diferentes irradiâncias e doses de nitrogênio**. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

DAVIES, P.J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 679p.

DELAPORTE, R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. Control de Calidad y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 39-46, 2001.

EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 10- 13, jan-mar 2004.

EMBRAPA, SOC: **Ambiente de software NTIA**, versão 4,2,2: Manual do usuário – ferramental estatístico, Campinas, 1997. 258p.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. Tese. (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292- 299, 2009.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 201- 205, set.- dez., 1998.

GHOSH, B.; SEM, S. Micropropagation of *Asparagus cooperi* as affected by growth regulators. **Biologia Plantarum**, v. 36, p. 527- 534, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York, Mac-Millan, 1983.v. 1, p. 117-227.

JUNEAU P; GREEN BR; HARRISON PJ. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, p. 75-83, 2005.

LUSA, M. G.; BIASI, L. A. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *Mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu- SP, v. 13, n. 1, p. 52-57, 2011.

MAIA, S. S. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, F. N.; OLIVEIRA, C. Enraizamento de *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau. (Lamiaceae) em função da posição da estaca no ramo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife- PE, v. 3, n. 4, p. 317- 320, out.- dez., 2008.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MOHAMED- YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellins and plant morphogenesis *in vitro*. **In vitro-Plant**, New York, v. 37, p. 204-205, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NANDA, K. K.; JAIN, M. K.; MALHOTRA, S. Effects of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. **Physiology Plantarum**, v. 24, p. 387-391, 1971.

NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, R. P.; FOGAÇA, M. A. F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria- RS, v. 29, p. 277- 283, 1999.

OLIVEIRA, G.L. et al. Enraizamento de estacas de *Lippia sidoides* Cham. utilizando diferentes tipos de estacas, substratos e concentrações do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.10, n.4, p.12-17, 2008.

PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. Vegetative propagation of *Mikania glomerata*: Micropropagation and cuttings. **Acta Horticulturae**, n. 502, p. 347- 352, 1999.

PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B.; DANTAS, A. C. M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n.1, p. 86- 89, jan.-mar., 2005.

POSPÍŠILOVÁ, J.; CATSKÝ, J.; ŠESTÁK, Z. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. In: PESSARAKLI, M. (Ed). **Handbook of Photosynthesis**. Marcel Dekker, New York, p 525–540, 1997.

RODRIGUES, I. C. S. **Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro***. 2010. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas, 2010.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91- 120, 2000.

SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, W. E.; DUARTE, R. C. C.; SIQUEIRA, D. L. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 1, p. 163-167, abril, 2002.

SILVA, C. G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 9, n.1, p. 29- 35, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THIMANN, K. V. Auxins and the growth of roots. **American Journal of Botany**. v. 23, p. 561-569, 1936.

ZANANDREA, I. et al. Característica Fotossintéticas de Macieira cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 885- 887, jul. 2007.

CAPÍTULO III

POTENCIAL GENOTÓXICO, ANTI-PROLIFERATIVO E ANTI-MUTAGÊNICO DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE) NO CICLO CELULAR DE *Allium cepa*

RESUMO

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze (Amaranthaceae) conhecida popularmente como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho, apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. Com base no amplo uso desta espécie para fins terapêuticos, o estudo avaliou o potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico do extrato aquoso das folhas de plantas submetidas a quatro sistemas de cultivo, usando o teste *Allium cepa*, e quantificou o conteúdo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico nas amostras. Para a avaliação do potencial genotóxico, foram utilizadas duas concentrações de extratos aquosos (5 g L^{-1} e 20 g L^{-1}) de folhas de plantas provenientes do campus da UFSM, casa de vegetação, micropropagação *in vitro* e estaquia *ex vitro* além do controle negativo (água destilada) e controle positivo (glifosato 5%). Os doseamentos de flavonoides e polifenóis foram feitos partir de leitura em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando quercetina como padrão e 730 nm utilizando ácido gálico como padrão, respectivamente. A quantificação de ácido clorogênico foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. Os picos foram identificados em comparação com o tempo de retenção da solução dos padrões, no comprimento de onda de 370 nm. Em ambos os procedimentos foram utilizadas amostras dos quatro sistemas de cultivo. Os resultados demonstraram que o índice mitótico foi superior em células submetidas aos tratamentos com extratos de folhas do campo (5 g L^{-1}) e da estaquia (20 g L^{-1}), não diferindo do controle negativo (água destilada). Os demais tratamentos apresentaram potencial anti-proliferativo com a redução do índice mitótico, não diferindo do controle positivo. Apenas o extrato das folhas da casa de vegetação (20 g L^{-1}) apresentou efeito genotóxico às células meristemáticas das raízes de *A. cepa*, onde a média de células com alterações cromossômicas (9,1) não diferiu do controle positivo (glifosato 5%) (11,9). Ocorreu atividade anti-mutagênica no extrato de folhas do campo (20 g L^{-1}), sobre as células de *A. cepa*, submetidas à alteração com glifosato, recuperando-se do efeito mutagênico com êxito. Quanto à quantificação dos metabólitos ocorreu uma maior concentração de flavonoides e ácido clorogênico nas amostras coletadas do campo, não diferindo das amostras da casa de vegetação quanto à quantidade de flavonoides. Com relação aos polifenóis encontrados houve um maior acúmulo nas amostras do campo, entretanto não ocorreu diferença significativa entre as amostras.

Palavras-chave: Penicilina. Teste *Allium cepa*. Metabólitos secundários.

1 INTRODUÇÃO

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze (Amaranthaceae) é uma espécie herbácea conhecida popularmente como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho. Suas folhas são utilizadas como antitérmico, as inflorescências para dores de cabeça, resfriados e gripes e as raízes contra diarreia (AGRA et al., 2007). Estudos comprovaram a atividade analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante de suas folhas (DELAPORTE et al., 2001; BARUA et al., 2012).

Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos. Em extrato aquoso e etanólico das folhas de *A. brasiliana* foi observada a presença de seis flavonoides *O*- glicosilados e quercetina, dentre eles dois tipos de flavonoides responsáveis pela atividade anti-proliferativa de linfócitos (BROCHADO et al., 2003).

Com base no uso de *A. brasiliana* para fins terapêuticos, são necessários estudos que investiguem o potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico desta espécie. Dentre os métodos utilizados para este fim destacam-se os bioensaios vegetais utilizando pontas de raízes de *Allium cepa* (cebola), essa espécie é utilizada pela sua alta sensibilidade aos compostos tóxicos e a ocorrência de cromossomos grandes, facilitando a observação das células (SINGH; DAS, 2002). Além disso, tem boa correlação com sistemas teste em mamíferos, sendo considerada eficiente para análise de monitoramento *in situ* da genotoxicidade de várias substâncias e ainda é um método de baixo custo (CHAUAN et al., 1999; SILVA et al., 2004).

As observações feitas nas células meristemáticas da raiz de cebola podem fornecer informações como o índice mitótico e a presença de alterações cromossômicas, tais como, pontes anafásicas, cromossomos perdidos e desorganização dos cromossomos, caracterizando-se como indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular, também fornecendo dados úteis como indicativo de proliferação adequada das células. Assim, a partir destes estudos a população pode ser alertada a respeito do efeito dos chás sobre as células (VICENTINI et al., 2001; GADANO et al., 2002).

Segundo Hazarika, (2003), o ambiente de cultivo *in vitro* e *ex vitro* das espécies pode influenciar na produção de compostos bioativos da planta e conseqüentemente no efeito dos chás, considerando as diferenças entre estes ambientes tais como a luminosidade (qualidade e quantidade), umidade relativa do ar, nutrientes, composição de gases e tipos de substrato e outras.

O conhecimento e a quantificação dos metabólitos secundários presentes no extrato das folhas também é relevante para a complementação do teste *Allium cepa*. Assim o estudo objetivou avaliar o potencial genotóxico, anti-proliferativo e anti-mutagênico do extrato

aquoso das folhas de plantas provenientes de quatro sistemas de cultivo em células radiculares de *Allium cepa*, e quantificar o conteúdo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico nos extratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas e no Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, pertencentes à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS.

2.1 Teste *Allium cepa*

Folhas frescas da região apical das hastes de *Alternanthera brasiliana* foram coletadas em plantas de diferentes proveniências: plantas existentes no campus da UFSM (coletadas em janeiro); plantas obtidas através do enraizamento de estacas de ramos (coletadas em março); plantas provenientes do cultivo em casa de vegetação climatizada (coletadas em março) e plantas micropropagadas *in vitro* (coletadas em maio).

As folhas das plantas advindas de cada sistema de cultivo foram mantidas no mínimo quarenta dias em temperatura ambiente para a secagem. O preparo dos extratos foi realizado através da infusão das folhas secas em água destilada a 100° C, mantida em temperatura ambiente durante 10 minutos e depois filtrada. As concentrações utilizadas dos extratos aquosos foram de 5 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹.

Os bulbos de *A. cepa* foram enraizados em água destilada e, após a formação de raízes de até 0,5 cm, foram transferidos para os extratos aquosos das folhas da espécie em estudo, permanecendo por 24 horas em temperatura ambiente.

Os tratamentos foram constituídos por extratos aquosos das folhas secas de plantas das quatro proveniências; controle negativo em água destilada e controle positivo em glifosato 5%. Para verificar a possível atividade anti-mutagênica do extrato aquoso de *A. brasiliana*

sobre as células de *A. cepa*, as raízes dos bulbos foram colocadas em glifosato 5% durante 24 horas e posteriormente no extrato aquoso por infusão das folhas secas do campus da UFSM em concentração de 20 g L^{-1} , por 24 horas.

Após a submissão das radículas aos tratamentos, as mesmas, com aproximadamente 5-10 mm de comprimento, foram coletadas dos bulbos e fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas, sendo então, transferidas para álcool 70% e conservadas no refrigerador até o momento das análises.

Para o preparo das lâminas foram utilizadas duas radículas de cada bulbo, estas foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, lavadas em água destilada e coradas comorceína acética 2%. A região meristemática das radículas foi fragmentada com o auxílio do bastão de vidro, e a lamínula colocada sobre o material (GUERRA; SOUZA, 2002).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos, cinco repetições (cinco bulbos de cebola) sendo que cada cebola teve duas raízes avaliadas (duas unidades experimentais) e para cada raiz foi preparada uma lâmina, totalizando dez unidades experimentais por tratamento. Analisou-se 500 células por lâmina, totalizando 1000 células por bulbo e 5000 células por tratamento com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40X. Foram contadas células em interfase (I), prófase (P), prófase desorganizada (PD), metáfase (M), metáfase desorganizada (MD), metáfase com cromossomo perdido (MCP), anáfase (A), anáfase desorganizada (AD), anáfase com cromossomo perdido (ACP), anáfase com ponte (AP), telófase (T) e telófase desorganizada (TD). O índice mitótico (IM) foi calculado somando-se as células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase), dividindo-se pelo total de células contadas e multiplicando-se por 100 (PIRES et al., 2001).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a análises complementares feitas através do teste Scott-Knott à 5% de probabilidade de erro, utilizando o software SOC (EMBRAPA, 1997).

2.2 Quantificação de Polifenóis totais, Flavonoides e Ácido clorogênico

Para estas análises foram utilizadas amostras de extrato aquoso das folhas apicais secas de *A. brasiliiana* de quatro proveniências: campus da UFSM; casa de vegetação; micropropagação e enraizamento de estacas.

Para a quantificação de polifenóis totais foi utilizado o método colorimétrico descrito por Chandra e Mejia (2004), onde 1,0 mL do reagente Folin Ciocalteu 2*N* foi adicionado em cada amostra de 5 mg mL⁻¹. Após cinco minutos, foram acrescentados 2,0 mL de carbonato de cálcio 20% e depois de 10 minutos foi obtida a absorbância em espectrofotômetro à 730 nm, e comparada com o branco (etanol absoluto) e o padrão (ácido gálico). O teor de polifenóis totais foi calculado através de uma curva de calibração $y = 30.767x - 0.0087$, $R = 0.9992$, utilizando ácido gálico como padrão nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,02 e 0,03 mg mL⁻¹, o resultado foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra.

O doseamento de flavonoides seguiu o método descrito por Woisky e Salatino (1998) com uso de 1,0 mL de cloreto de alumínio 2% e leitura em espectrofotômetro a 420 nm, e comparada com o branco (etanol absoluto) e o padrão (quercetina). Para o cálculo do teor de flavonoides foi utilizada uma curva de calibração $y = 40,175x + 0,001$, $R = 0,9998$, através do padrão quercetina nas concentrações 0,002; 0,006; 0,01; 0,014 e 0,018 mg mL⁻¹, os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de quercetina por grama de extrato.

Para a quantificação de ácido clorogênico as quatro amostras foram avaliadas através do método de Huber et al. (2007), com modificações. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan), e coluna Phenomenex C-18 (250 mm x 4.6 mm), empacotada com partículas de 5 µm de diâmetro. A fase móvel utilizada foi água destilada e metanol (v/v) acrescida de 0,3% de ácido fórmico, com eluição em gradiente. O gradiente iniciou com 20:80 de MeOH:H₂O (acidificados), 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, com gradiente linear, e fluxo de 0.8 mL/min, com volume de injeção de 20 µL. Os picos foram identificados em comparação com o tempo de retenção da solução dos padrões, no comprimento de onda de 370 nm. As curvas de calibração do padrão ácido clorogênico (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg mL⁻¹) foram $y = 4.799.255x + 1.406.102$, $R = 0.9983$. Apresentando tempo de retenção de 4,9 minutos. Os testes foram realizados em triplicatas e a comparação das médias entre as amostras foi realizada através do Teste T de Student, no aplicativo Office Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste *Allium cepa*

A tabela 1 mostra o número total de células analisadas, número total de células em mitose, índice mitótico e número de células em intérfase, prófase (Figura 1A), metáfase (Figura 1B), anáfase (Figura 1C) e telófase (Figura 1D) de *Allium cepa* submetida aos tratamentos.

Conforme os dados da tabela, o índice mitótico foi superior em células tratadas com extrato aquoso das folhas de plantas cultivadas no campus da UFSM (5 g L⁻¹) e de plantas da estaquia (20g L⁻¹), com 38,56 e 25,76 %, respectivamente, não diferindo do controle negativo em água destilada com 27,52%. Os demais tratamentos apresentaram um índice mitótico menor entre 20,92% e 2,7%, incluindo o controle positivo em glifosato 5%. Estes resultados sugerem que os tratamentos com índice mitótico menor em relação ao controle negativo estão causando efeito anti-proliferativo, reduzindo o índice mitótico nas células de *Allium cepa*.

Frescura (2012), obteve resultados semelhantes, onde o extrato das folhas de *Psychotria brachypoda* e *P. birotula* cultivadas no campo, nas doses de 5 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹, apresentaram efeito anti-proliferativo nas células de *A. cepa*. Lubini et al. (2008) observaram o mesmo efeito proporcionado pelo extrato de folhas de *Psychotria leiocarpa* e *P. myriantha*. O extrato aquoso das folhas de *Solidago microglossa* (14 mg mL⁻¹) também causou efeito anti-proliferativo e citotóxico em células de *A. cepa* (BAGATINI et al., 2009). Fachinetto et al. (2007), verificaram o efeito anti-proliferativo de infusões das folhas de *Achyrocline satureioides* sobre células de *A. cepa*, atribuindo este resultado à atividade dos compostos químicos presentes na infusão.

Tabela 1 - Total de células analisadas (TCA), Número total de células em mitose do meristema radicular de *Allium cepa* (TCM), índice mitótico (IM), células em Interfase (I), Prófase (P), Metáfase (M), Anáfase (A) e Telófase (T) submetidas aos tratamentos com extrato aquoso das folhas secas de *A. brasiliana* provenientes de quatro sistemas de cultivo. Santa Maria – RS.

TRATAMENTO	TCA	TCM	IM (%)	I	P	M	A	T
T1	500	137.6 a	27.52 a	361.9 b	117.5 a	10.9 a	3.5 b	5.7 a
T2	500	192.8 a	38.56 a	320.9 b	156.4 a	17.7 a	7.4 a	10.6 a
T3	500	67.5 b	13.5 b	432.5 a	37.7 b	13.4 a	3.4 b	11.7 a
T4	500	42.7 b	8.54 b	457.3 a	26 b	6.5 a	2.9 b	6.3 a
T5	500	104.6 b	20.92 b	395.4 b	56.5 b	18.7 a	7.9 a	20.5 a
T6	500	99.1 b	19.82 b	411.5 a	69.2 b	13 a	4.5 b	10.9 a
T7	500	128.8 a	25.76 a	371.2 b	77 b	18.8 a	12.2 a	19.2 a
T8	500	82 b	16.4 b	417.9 a	41.8 b	19.7 a	4.7 b	12.7 a
T9	500	99.5 b	19.9 b	395.3 b	50 b	17.9 a	6.9 a	15.6 a
T10	500	13.5 b	2.7 b	486.5 a	6 b	2.8 a	1.6 b	3.1 a
T11	500	70.6 b	14.12 b	428.7 a	28.3 b	14.8 a	2.6 b	13.9 a
CV(%)		64.59	64.59	14.5	78.76	73.24	70.55	79.19

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

T1: Água destilada (Controle Negativo);

T2: Extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 5 g L⁻¹;

T3: Extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 20 g L⁻¹;

T4: Extrato de folhas de plantas da Micropropagação 5 g L⁻¹;

T5: Extrato de folhas de plantas da Micropropagação 20 g L⁻¹;

T6: Extrato de folhas de plantas da Estaquia 5 g L⁻¹;

T7: Extrato de folhas de plantas da Estaquia 20 g L⁻¹;

T8: Extrato de folhas de plantas da Casa de Vegetação 5 g L⁻¹;

T9: Extrato de folhas de plantas da Casa de Vegetação 20 g L⁻¹;

T10: Glifosato 5% + 24 hrs em extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 20 g L⁻¹;

T11: Glifosato 5% (Controle Positivo).

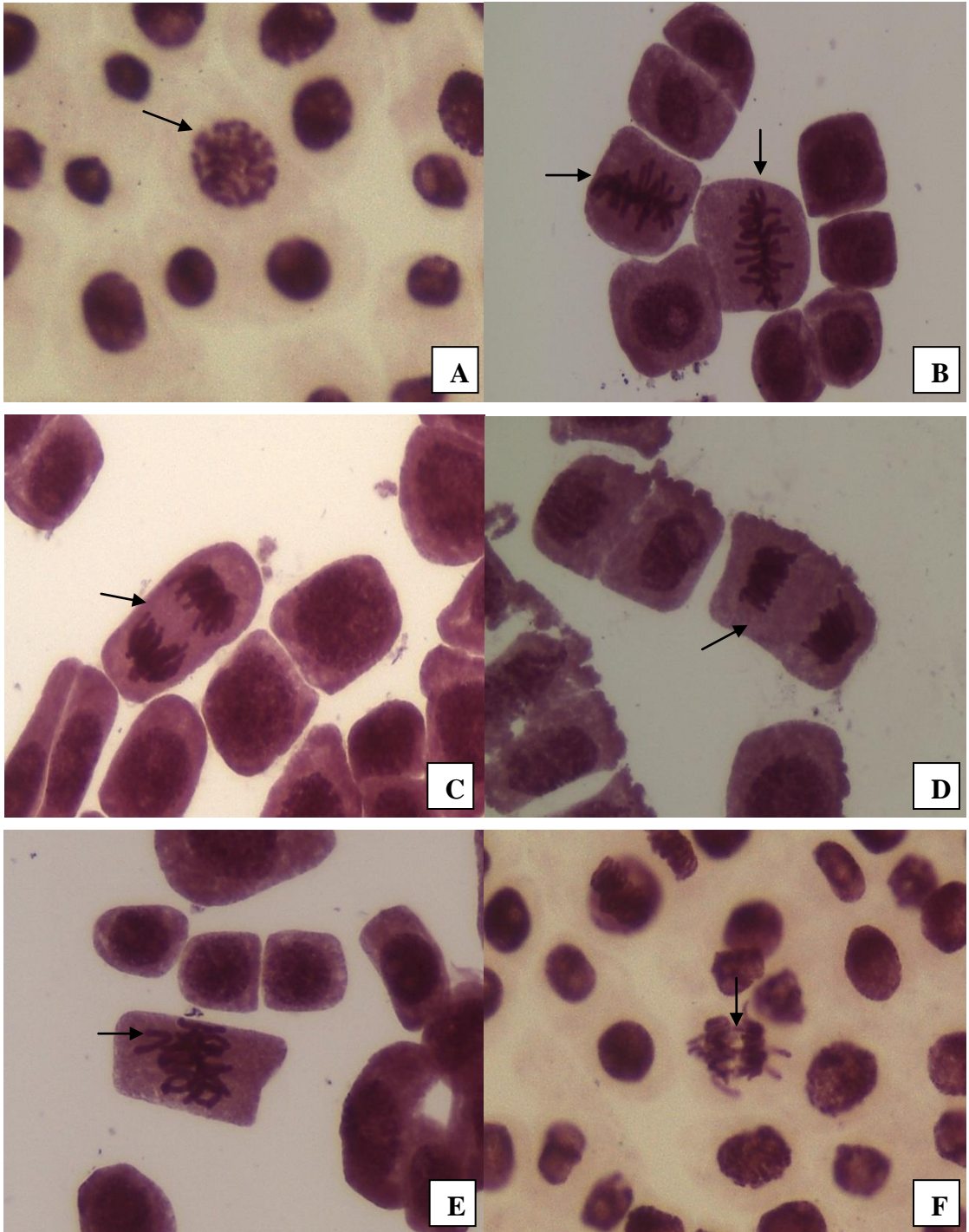




Figura 1 - Células de *A. cepa* submetidas aos extratos aquosos de *A. brasiliana*, controle negativo e controle positivo. Seta indicando prófase normal (A); setas indicando metáfase normal (B); seta indicando anáfase normal (C); seta indicando telófase normal (D); seta indicando cromossomo perdido (E); seta indicando anáfase com ponte (F) e seta indicando cromossomos desorganizados (G).

A tabela 2 mostra o número total de células em mitose, número de cromossomos perdidos (Figura 1E), anáfases com ponte (Figura 1F), cromossomos desorganizados (Figura 1G) e total de células com anormalidades no ciclo mitótico das células de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos.

Nos dados da tabela verifica-se a avaliação de atividade anti-mutagênica do extrato aquoso das folhas de *A. brasiliana*, sobre as células de *A. cepa*, no tratamento 10, o extrato utilizado proporcionou efeito anti-mutagênico ocorrendo diferença significativa com relação ao controle positivo, indicando que as células submetidas à alteração com glifosato 5% conseguiram recuperar-se das anormalidades causadas por ele com êxito ao serem tratadas com extrato de folhas de *A. brasiliana* cultivadas no campus da UFSM (20 g L⁻¹), proporcionando efeito anti-mutagênico nas células de *A. cepa*. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Teixeira et al. (2003), onde o extrato das folhas de *Psidium guajava* e *Achillea millefolium* causaram efeito anti-mutagênico às células de *A. cepa*. O extrato das folhas de *Plantago lanceolata* causou não só efeito anti-mutagênico, mas também anti-proliferativo (ÇELIK; ASLANTÜRK, 2006).

O extrato das folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação (20 g L⁻¹) proporcionou efeito mutagênico com média de 9,1 no total de células com alterações cromossômicas, não diferindo do controle positivo em glifosato 5%, com 11,9. Os demais tratamentos não diferiram do controle negativo com médias entre 3,1 e 0. Este resultado

poderia ser explicado pela idade das plantas provenientes da casa de vegetação, apesar de terem sido utilizadas folhas jovens da região apical, as plantas tinham seis meses de idade. Conforme Gobbo Neto e Lopes (2007) a idade e o desenvolvimento da planta podem influenciar na quantidade total de metabólitos produzidos e a concentração destes pode levar à toxicidade do extrato.

Resultados semelhantes foram obtidos por Dalla- Nora et al. (2010), onde o extrato das folhas de *Mikania glomerata* em concentrações de 4g L⁻¹ e 16 g L⁻¹ proporcionaram alterações cromossômicas significativas nas células de *A. cepa*, considerando o extrato nestas concentrações genotóxico. O extrato das folhas da espécie *Psycotria myriantha* na concentração de 1,13 mg mL⁻¹ também proporcionou atividade genotóxica em células de *A. cepa* (LUBINI et al. 2008). Já para Bagatini et al., (2009) não foi observado efeito genotóxico às células de *A. cepa* utilizando o extrato aquoso das folhas de *Solidago microglossa* em concentração de 14 mg mL⁻¹.

Tabela 2 - Média do número total de células em mitose do meristema radicular de *Allium cepa*, Cromossomos perdidos (CP), Anáfases com ponte (AP), Cromossomos desorganizados (CD) e Total de células com anormalidades (TCA), submetidas aos tratamentos com extrato aquoso das folhas secas de *A. brasiliana* provenientes de quatro sistemas de cultivo. Santa Maria – RS.

TRATAMENTO	TCM	CP	AP	CD	TCA
T1	137.6 a	0 b	0 a	0 b	0 b
T2	192.8 a	0 b	0 a	0.7 b	0.7 b
T3	67.5 b	0.1 b	0.1 a	1.1 b	1.3 b
T4	42.7 b	0.3 b	0 a	0.7 b	1 b
T5	104.6 b	0.2 b	0 a	0.8 b	0.7 b
T6	99.1 b	0 b	0.2 a	1.3 b	1.5 b
T7	128.8 a	0.3 b	0 a	1.3 b	1.6 b
T8	82 b	0.6 a	0 a	2.5 b	3.1 b
T9	99.5 b	1.6 a	0.1 a	7.4 a	9.1 a
T10	13.5 b	0 b	0 a	0 b	0 b
T11	70.6 b	0.9 a	0.4 a	10.4 a	11.9 a
CV(%)	64.59	33.79	19.91	49.77	52.7

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

T1: Água destilada (Controle Negativo);

T2: Extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 5 g L⁻¹;

T3: Extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 20 g L⁻¹;

T4: Extrato de folhas de plantas da Micropropagação 5 g L⁻¹;

T5: Extrato de folhas de plantas da Micropropagação 20 g L⁻¹;

T6: Extrato de folhas de plantas da Estaquia 5 g L⁻¹;

T7: Extrato de folhas de plantas da Estaquia 20 g L⁻¹;

T8: Extrato de folhas de plantas da Casa de Vegetação 5 g L⁻¹;

T9: Extrato de folhas de plantas da Casa de Vegetação 20 g L⁻¹;

T10: Glifosato 5% + 24 hrs em extrato de folhas de plantas do Campus da UFSM 20 g L⁻¹;

T11: Glifosato 5% (Controle Positivo).

3.2 Quantificação de Polifenóis totais, Flavonoides e Ácido clorogênico

A tabela 3 mostra os valores de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico presentes em amostras de extrato aquoso das folhas das seguintes proveniências: campus da UFSM; casa de vegetação; micropropagação e enraizamento de estacas.

Conforme a tabela ocorreu maior acúmulo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico nas amostras coletadas no campus da UFSM, com médias de $1,03 \pm 0,19$; $2,41 \pm 0,01$ e $130,0 \pm 0,024$ mg g⁻¹ de extrato, respectivamente, onde não houve efeito mutagênico no teste *Allium cepa*, sugerindo que estes metabólitos não foram responsáveis pela mutagenicidade causada nas células submetidas ao tratamento com extrato das folhas cultivadas em casa de vegetação (20 g L⁻¹), que apresentaram valores significativamente inferiores quanto ao acúmulo de ácido clorogênico $64,0 \pm 0,001$ mg g⁻¹ de extrato.

Resultados onde o ambiente de cultivo proporciona diferenças quanto ao acúmulo de compostos bioativos podem ser explicados devido a fatores existentes no ambiente em questão. No caso de *A. brasiliense* o ambiente externo do campus da UFSM favoreceu o acréscimo de metabólitos nas amostras. Dentre os fatores existentes no campo está a incidência de radiação ultravioleta, que, segundo alguns estudos, pode desencadear reações químicas que aumentam a quantidade de compostos secundários, tais como alguns tipos de flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outro fator relevante é o estresse nutricional que pode resultar em aumento nas concentrações de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Isto talvez explique os resultados obtidos para as plantas do campo, considerando o estresse nutricional que pode ter ocorrido apenas para essas plantas, já que as demais foram tratadas com solo adubado e meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Taleb-Contini et al. (2006) observaram que as técnicas de propagação vegetativa utilizadas com as plantas de *Mikania glomerata* proporcionaram resultados diferentes quanto ao acúmulo de metabólitos secundários. Segundo os autores, plantas propagadas através da estaquia produziram cumarina e ácido caurenóico, enquanto as plantas micropropagadas *in vitro* acumularam apenas cumarina.

O acúmulo de flavonoides, superior no extrato aquoso de folhas das plantas do campus da UFSM, pode ter causado o efeito anti-proliferativo nas células de *Allium cepa*, assim como ocorreu em trabalho realizado por Brochado et al. (2003), onde os flavonoides Kaempferol 3-*O*-robinobiosídeo e kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, encontrados em extrato etanólico das folhas de *A. brasiliense*, causaram efeito anti-proliferativo em linfócitos humanos *in vitro*. Os flavonoides presentes na espécie *Humulus lupulus* L. também proporcionaram atividade citotóxica e anti-proliferativa no ciclo mitótico das células cancerígenas de próstata (DELMULLE et al., 2006).

Os polifenóis podem estar envolvidos na atividade anti-mutagênica proporcionada pelo extrato aquoso das folhas do campus da UFSM, sobre as células de *A. cepa*. Mukhtar et al. (1994) relacionaram o efeito anti-mutagênico e anti-carcinogênico do chá verde à presença de polifenóis na planta.

Tabela 3 - Conteúdo de polifenóis, flavonoides e ácido clorogênico nas amostras de extrato aquoso das folhas apicais secas de plantas do campus da UFSM (C), casa de vegetação (CV), micropropagação (M) e estacas (E) de *Althernanthera brasiliana*.

	Polifenóis (mg EAG/g extrato) ± DP	Flavonoides (mg EAQ/g extrato) ± DP	Ác. clorogênico (mg Ác. Clorog./g amostra) ± DP
C	1,03 ± 0,19 a	2,41 ± 0,01a	130,0 ± 0,024 a
CV	0,81 ± 0,10 a	2,39 ± 0,03 ab	64,0 ± 0,001 d
M	0,86 ± 0,46 a	0,59 ± 0,005 d	80,0 ± 0,025 b
E	0,59 ± 0,31a	1,27 ± 0,03 c	69,0 ± 0,002 bc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste t de Student a 5% de probabilidade de erro. DP: Desvio Padrão; mg EAG/g amostra: miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra; mg EQ/g amostra: miligrama de equivalente de quercetina por grama de amostra; mg Ac. Clorog./g amostra: miligrama de ácido clorogênico por grama de amostra.

4 CONCLUSÕES

- A água destilada (controle negativo), o extrato aquoso de folhas de plantas de *Alternanthera brasiliana* provenientes do Campus da UFSM na concentração de 5 g L⁻¹ e da estaquia na dose de 20 g L⁻¹ não apresentam efeito anti-proliferativo nas células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*;
- O extrato das folhas de plantas de *A. brasiliana* da casa de vegetação (20 g L⁻¹) apresenta efeito genotóxico nas células de *A. cepa*;
- Ocorreu atividade anti-mutagênica do extrato de folhas de plantas de *A. brasiliana* do Campus da UFSM (20 g L⁻¹), sobre as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, submetidas à alteração com glifosato 5%;
- Há uma maior concentração de flavonoides e ácido clorogênico nas amostras coletadas do campus da UFSM;

- O acúmulo de polifenóis encontrados não difere entre as amostras de plantas das quatro procedências (plantas do campus da UFSM, casa de vegetação, micropropagação e estaquia).

5 REFERÊNCIAS

AGRA, A. M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 111, p. 383–395, 2007.

BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, C. F.; TEDESCO, S. B. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 632- 636, abr./jun. 2009.

BARUA, C.C. et al. Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on Altered Antioxidant Enzyme Profile during Cutaneous Wound Healing in Immunocompromised Rats. **ISRN Pharmacology**, 8 p. 2012.

BROCHADO, C. O. et al. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *In Vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

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.

ÇELİK, T. A.; ASLANTÜRK, Ö. S. Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. **Biologia, Bratislava**, v. 61, p. 693—697, 2006.

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, p. 95- 101, 2010.

DELAPORTE, R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. Control de Calidad y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 39-46, 2001.

DELMULLE, L. et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. **Phytomedicine**, v.13, p. 732-734, 2006.

EMBRAPA, SOC: **Ambiente de software NTIA**, versão 4,2,2: Manual do usuário – ferramental estatístico, Campinas, 1997. 258p.

FACHINETTO, J. M; BAGATINI, M. D; DURIGON, J; SILVA, A. C. F; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

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

GADANO, A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, p. 11-16, 2002.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec, 2002.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704 -1712, 2003.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

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

MUKHTAR, H. et al. Green tea and skin-anticarcinogenic effects. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 3-7, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

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.

SINGH, R. B.; DAS, U.C. Chromotoxic and mito- inhibitory effects of *Lathyrus sativus* seed extract on root tip cells of *Vicia faba*. **Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring**, v. 12, p. 95- 99, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TALEB-CONTINI, S. H. et al. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 596-598, dez. 2006.

TEIXEIRA, R. O.; MARJORI, L. C.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E .P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551- 555, 2003.

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, 2001.

WOISKY, R.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.