

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

**GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, COMPOSTOS  
FENÓLICOS E VIABILIDADE POLÍNICA DE *PSIDIUM  
CATTLEIANUM* SABINE (MYRTACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carmine Aparecida Lenz Hister**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, COMPOSTOS  
FENÓLICOS E VIABILIDADE POLÍNICA DE *PSIDIUM  
CATTLEIANUM* SABINE (MYRTACEAE)**

**Carminé Aparecida Lenz Hister**

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

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**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**

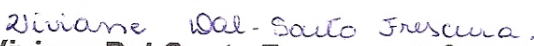
**GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS E  
VIABILIDADE POLÍNICA DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* SABINE  
(MYRTACEAE)**

elaborada por  
**Carmine Aparecida Lenz Hister**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

  
**Viviane Dal-Souto Frescura, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

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

Santa Maria, 06 de março de 2015.

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

Hister, Carmine Aparecida Lenz  
GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS E  
VIABILIDADE POLÍNICA DE PSIDIUM CATTLEIANUM SABINE  
(MYRTACEAE) / Carmine Aparecida Lenz Hister.-2015.  
86 f. ; 30cm

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

1. Allium cepa 2. Araçá 3. Cromatografia líquida 4.  
Índice mitótico 5. Pólen I. Tedesco, Solange Bosio II.  
Título.

---

© 2015

Todos os direitos reservados a Carmine Aparecida Lenz Hister. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Email: carmineh@gmail.com

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por iluminar meus passos, me guiando pelo melhor caminho e me fazendo chegar até esse momento tão especial.

Aos meus pais, José e Griselda, que sempre me incentivaram em meus estudos e que são meus exemplos. Espero poder orgulhá-los sempre.

Ao meu irmão Dionei que, mesmo distante, sempre me apoiou e incentivou para que eu fosse atrás de meus objetivos.

Ao meu noivo Jonas, que sempre esteve presente nessa caminhada, teve paciência e aceitou os momentos que precisei estar ausente. Obrigada pelo companheirismo e pelas palavras de incentivo. Tenha essa conquista como sua também. Te amo.

À querida Orientadora Professora Solange, que estava sempre disposta a me auxiliar e que me ensinou a pensar positivamente. Agradeço por ter sido uma grande amiga a quem tomarei como exemplo no decorrer e minha trajetória.

Aos demais mestres do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, que muito contribuíram com minha formação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos companheiros do laboratório LABCITOGEN, com quem dividi frustrações e alegrias. Em especial à Viviane, Andrielle, Marília, Kássia, Jéssica e Marina.

Aos colegas do Mestrado em Agrobiologia, pelo carinho, amizade e companheirismo durante a rotina de aulas e experimentos.

Em um mundo dito cruel e competitivo, tive a alegria de conviver e trabalhar com pessoas dispostas ao bem, a ajudar, fiz amigos que levarei comigo a vida toda.

Muito Obrigada!

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”**

**Madre Teresa de Calcutá**

## RESUMO

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

### GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS E VIABILIDADE POLÍNICA DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* SABINE (MYRTACEAE)

AUTORA: CARMINE APARECIDA LENZ HISTER  
ORIENTADOR: SOLANGE BOSIO TEDESCO  
Santa Maria, 06 de março de 2015.

*Psidium cattleianum* Sabine, também conhecido como araçá, é uma espécie nativa do Brasil, valorizada pelo alto teor de vitamina C em seus frutos, que são consumidos *in natura*. Além disso, também é uma espécie utilizada com fins medicinais. O uso de plantas como recurso terapêutico é uma prática bastante difundida na medicina popular mundial e, apesar dessa generalidade da fitoterapia, são poucos os estudos sobre a composição química das plantas, bem como sobre os seus potenciais riscos à saúde da população. Além disso, a caracterização de germoplasma de uma espécie, a exemplo da determinação da viabilidade polínica, é importante na manutenção de um banco de informações que podem ser úteis em trabalhos futuros. Tendo em vista que algumas plantas apresentam efeitos adversos, o presente trabalho objetivou analisar o efeito antiproliferativo e genotóxico do suco dos frutos de *P. cattleianum* e do extrato aquoso de suas folhas usando o sistema-teste de *Allium cepa* L. (cebola). Ademais, o presente também objetivou realizar a análise de seus grãos de pólen e estimar sua viabilidade através de diferentes técnicas de coloração. Frutos de três acessos foram utilizados no preparo dos sucos na concentração de 125 g.L<sup>-1</sup>, e folhas secas de quatro acessos foram utilizadas na preparação dos extratos aquosos em duas concentrações diferentes: 15 g.L<sup>-1</sup> e 75 g.L<sup>-1</sup>, sendo utilizada a água destilada como controle negativo e o glifosato como controle positivo. Foi analisada a inibição da divisão celular e também a presença de danos cromossômicos nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Para a determinação dos compostos fenólicos, as amostras dos sucos e dos extratos aquosos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A viabilidade polínica de vinte acessos de *P. cattleianum* foi determinada usando dois métodos de coloração. A análise estatística foi realizada pelos testes Qui-quadrado e Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). A análise da genotoxicidade mostrou que o suco de araçá induziu a proliferação celular e alterações cromossômicas, além de inibir a formação do fuso mitótico em *A. cepa*. Os extratos preparados com as folhas dos quatro acessos reduziram a proliferação celular, no entanto, apenas o extrato das folhas coletadas no município de Cerro Largo (CL) induziu alterações cromossômicas. Os sucos e os extratos aquosos das folhas apresentaram na sua constituição os compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, epicatequina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol. A viabilidade polínica determinada pela orceína acética 2% foi superior a 97,9%, enquanto que com o reativo de Alexander variou entre 43% e 97%. Conclui-se que o suco de araçá possui efeito proliferativo, genotóxico e antimitótico em *A. cepa*, enquanto que os extratos aquosos são antiproliferativos e o acesso CL é genotóxico, o que pode ser extrapolado para outros tipos celulares eucarióticos. Os compostos fenólicos majoritários no suco são de epicatequina (dois acessos) e isoquercitrina (um acesso). Quercitrina é o composto fenólico predominante no extrato aquoso das folhas de um acesso e quercitina nos demais. Conclui-se também que o reativo de Alexander foi mais fiel à viabilidade real, principalmente devido à dupla coloração oferecida por esse corante (verde de malaquita e fucsina ácida).

**Palavras-chave:** *Allium cepa*. Araçá. Cromatografia líquida. Índice mitótico. Pólen.

## ABSTRACT

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

### GENOTOXICITY, CITOTOXICITY, PHENOLIC COMPOUNDS AND POLLEN VIABILITY OF *PSIDIUM CATTLEIANUM* SABINE (MYRTACEAE)

AUTHOR: CARMINE APARECIDA LENZ HISTER  
ADVISER: SOLANGE BOSIO TEDESCO  
Santa Maria, March 06, 2015.

*Psidium cattleianum* Sabine, also known as strawberry guava, is a Brazilian native species whose fruits are valued for a high level of vitamin C, which are consumed *in natura*. Besides, it is also a species used for medicinal purposes. The use of plants as a therapeutic resource is a widely spread practice in popular medicine worldwide, although there have been few studies about their chemical composition as well as their potential risks to human health. Besides, the germplasm characterization of a species, as the pollen viability determination for instance, is important in maintaining a database that may be useful for future research. Considering that some plants cause adverse effects, the purpose of the present study was to analyze the antiproliferative and genotoxic effect of strawberry guava juice and strawberry guava leaf aqueous extracts by *Allium cepa* test system. This study also aimed at analyzing strawberry guava pollen grains through different colorimetric techniques so as to assess their viability. Fruits from three accessions were used for preparing juice at the concentration of 125 g.L<sup>-1</sup>, and dried leaves from four accessions were used for preparing aqueous extracts at the concentrations of 15 g.L<sup>-1</sup> and 75 g.L<sup>-1</sup>. Distilled water was used as negative control, whereas glyphosate served as positive control. Inhibition of cell division as well as the occurrence of chromosomal abnormalities in the meristematic cells of *Allium cepa* roots were also analyzed. In order to identify the phenolic compounds, juice and aqueous extract samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The pollen viability of twenty accessions was determined by two colorimetric methods. The statistical analysis was carried out using Chi-square and Scott-Knott tests ( $p < 0,05$ ). The analysis of genotoxicity showed that the strawberry guava juice induced cell proliferation and chromosomal abnormalities, besides inhibiting the formation of the mitotic spindle. The extracts prepared with leaves from four strawberry guava accessions caused a decrease in cell proliferation, however, only the extracts prepared with leaves collected in Cerro Largo (CL) induced chromosomal alterations. The following phenolic compounds were identified in the composition of the strawberry guava juice and the leaf aqueous extracts: gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, epicatechin, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin and kaempferol. The pollen viability determined through 2% acetic orcein was higher than 97,9%, and between 43% and 97% when determined through Alexander's stain. One concluded that the strawberry guava juice has proliferative, genotoxic and anti-mitotic action upon *Allium cepa*. Moreover, the leaf aqueous extracts produce an antiproliferative effect, whereas the accession collected in Cerro Largo is genotoxic, which may be valid to other types of eukaryotic cells. The most predominant phenolic compounds identified in the strawberry guava juice were epicatechin (two accessions) and isoquercitrin (one accession). Quercitrin was the most predominant compound in the leaf aqueous extracts from one accession, and quercetin was the most predominant one in the remaining accessions. One also concluded that the Alexander's stain was more accurate in regard to the actual pollen viability mainly due to its two stains (green malachite and fuchsine).

**Keywords:** *Allium cepa*. Strawberry guava. Liquid chromatography. Mitotic index. Pollen.



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1 – Irregularidades encontradas nas células de *Allium cepa* submetidas aos diversos tratamentos: a) seta mostrando micronúcleo no tratamento com suco de araçá amarelo (acesso de Distrito de Palma - T3); b) seta indicando ponte na telófase no tratamento com suco de araçá vermelho (acesso UFSM - T4); c) células em apoptose no tratamento com glifosato 1% (T5). Células apresentando metáfases irregulares: d,e) tratamento com suco de araçá amarelo (acesso Distrito de Arroio Grande - T2); f) tratamento com suco de araçá amarelo (acesso de Distrito de Palma - T3); g) tratamento com suco de araçá vermelho (acesso UFSM - T4). Escala: 10µm. .... 25

Figura 2 – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência do suco dos frutos de *Psidium cattleianum* Sabine: a) acesso 1 – Distrito de Arroio Grande (DAG); b) acesso 2 – Distrito de Palma (DP); c) acesso 3 – UFSM; detecção UV a 327 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), isoquercetrina (pico 9), quercitina (10) e canferol (pico 11). .... 27

### ARTIGO 2

FIGURA 1 – Células meristemáticas de raízes de cebola em divisão celular: a) tratamento T1 (controle negativo) – anáfase normal; b) T4 (extrato aquoso 15g.L<sup>-1</sup>, acesso Segredo) – metáfase normal; c) T2 (extrato aquoso 15g.L<sup>-1</sup>, acesso Cerro Largo) – metáfase com quebra cromossômica (seta); d) T6 (extrato aquoso 15g.L<sup>-1</sup>, acesso Tupanciretã) – metáfase irregular; e) T10 (controle positivo) – anáfase com ponte e quebra; f) ponte na anáfase em T10. Escala: 10µm. .... 49

FIGURA 2 – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos aquosos de folhas de *Psidium cattleianum* Sabine: a) acesso 1 – Cerro Largo (CL); b) acesso 2 – Segredo (SE); c) acesso 3 – Tupanciretã (TU); d) acesso 4 – Silveira Martins (SiM); detecção UV a 327 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), isoquercetrina (pico 9), quercitina (10) e canferol (pico 11). .... 50

### ARTIGO 3

FIGURA 1 – Grãos de pólen submetidos a diferentes métodos de coloração. Orceína acética 2%: a) Grão de pólen viável tamanho médio (de 0,5 a 1 cm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); b) pólen diminuto - seta (tamanho menor que 0,5 cm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); c) Polens viáveis de tamanho grande (maior que 1 cm) – acesso 13 (Cerro Largo 6). Reativo de Alexander: d) Pólen viável e inviável de tamanho médio (acesso 10 - Cerro Largo 3); e) Pólen inviável, tamanho pequeno – (acesso 13 - Cerro Largo 6); f) Pólen de tamanho grande, inviável (acesso 14 - Silveira Martins 1). Escala: 10µm. .... 68

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Número de células de *Allium cepa* analisadas nos diferentes tratamentos e seus respectivos índices mitóticos (IM), incluindo células em interfase, em divisão celular e com irregularidades. .... 24

Tabela 2 – Número e tipo de irregularidades encontradas nas células de *Allium cepa* submetidas aos diversos tratamentos, e média de células com alterações. .... 26

Tabela 3 – Compostos fenólicos e flavonoides em frutos de *Psidium cattleianum* Sabine de três acessos distintos, obtidos por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE). .... 28

### ARTIGO 2

TABELA 1 – Número de células de *Allium cepa* analisadas em interfase, em divisão, presença de irregularidades e ainda índices mitóticos (IM) dos diversos controles e tratamentos com extratos aquosos por decocção das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine em diferentes concentrações e para populações distintas, bem como tratamentos de recuperação. .... 45

TABELA 2 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine de quatro acessos distintos, obtidos por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE). .... 51

### ARTIGO 3

TABELA 1 – Estimativa (%) da viabilidade polínica entre corantes dentro de cada acesso e entre acessos dentro de cada corante, em 20 acessos de *Psidium cattleianum* Sabine provenientes do estado do RS. .... 64

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>ARTIGO 1 - DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E PROLIFERATIVO DOS FRUTOS DE <i>PSIDIUM CATTLEIANUM</i> SABINE (MYRTACEAE)</b> .....	16
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
<i>Coleta de material botânico</i> .....	20
<i>Preparo dos sucos</i> .....	20
<i>Análise dos sucos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)</i> .....	20
<i>Tratamentos e critérios de análise</i> .....	22
<i>Análise Estatística</i> .....	23
RESULTADOS .....	24
<i>Análise da mitose</i> .....	24
<i>Análise da CLAE</i> .....	26
DISCUSSÃO .....	28
REFERÊNCIAS .....	33
<b>ARTIGO 2 - DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS DE <i>PSIDIUM CATTLEIANUM</i> SABINE (MYRTACEAE)</b> .....	37
RESUMO .....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
<i>Coleta de material botânico</i> .....	41
<i>Preparo dos extratos aquosos</i> .....	41
<i>Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)</i> .....	41
<i>Tratamentos e critérios de análise</i> .....	43
<i>Análise estatística</i> .....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS .....	53
<b>ARTIGO 3 - AVALIAÇÃO COLORIMÉTRICA DOS GRÃOS DE PÓLEN DE <i>PSIDIUM CATTLEIANUM</i> SABINE (MYRTACEAE)</b> .....	59
RESUMO .....	59
ABSTRACT .....	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS .....	62
<i>Coleta de material botânico</i> .....	62
<i>Preparo das lâminas e critérios de análise</i> .....	63
<i>Análise estatística</i> .....	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
REFERÊNCIAS .....	69
<b>DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 3,5 bilhões de pessoas de países em desenvolvimento confiam e fazem uso do tratamento à base de plantas medicinais. Em todo o mundo, aproximadamente 85% das pessoas são praticantes de sistemas tradicionais de cura a base de plantas (RAI et al. 2000). Entre os fármacos empregados nos países industrializados, estima-se que 25% tenham sido desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

No entanto, o consumo indiscriminado de chás ou derivados merece uma atenção especial, devido ao desconhecimento de seus constituintes químicos, que podem causar, muitas vezes, mais danos à saúde que benefícios. Os componentes da biodiversidade necessitam maiores estudos em seus ecossistemas naturais, visto que uma pequena parte de seus princípios ativos foi adequadamente estudada e cujos benefícios permanecem desconhecidos (GUERRA; NODARI, 2007). Os prováveis efeitos tóxicos de muitas plantas ainda são ignorados, portanto devem-se utilizar apenas aquelas cujos efeitos sejam bem conhecidos (MARTINS et al., 2003).

Dentre as espécies utilizadas na medicina popular e que requerem atenção especial está *Psidium cattleianum* Sabine, pertencente à família Myrtaceae. Uma espécie de Mata Atlântica, com altura de três a seis metros, que ocorre naturalmente desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Popularmente é conhecida por diversos nomes: araçá, araçá-vermelho, araçá-rosa, araçá-amarelo, araçá-de-coroa (LORENZI, 1992). A folhagem do araçá é perene, as folhas são simples, opostas, glabras, aspecto coriáceo e de forma ovalada. As flores apresentam coloração branca e são solitárias, diclamídeas, pentâmeras, hermafroditas e com simetria bilateral. Os frutos são bagas globosas de coloração vermelha ou amarela, apresentando uma coroa de sépalas persistentes, com polpa suculenta de sabor agradável, sendo que a maturação dos frutos ocorre de janeiro a março (LORENZI et al., 2006).

São reconhecidos dois morfotipos da mesma espécie (morfotipo amarelo e morfotipo vermelho), que além da coloração dos frutos apresentam diferenças quanto ao tamanho e constituintes químicos das folhas (VARELLA et al., 2007),

anatomia do lenho (MARCHIORI; SANTOS, 2009), hábito/porte e região de ocorrência (SOUSA; SOBRAL, 2007).

*Psidium cattleianum* é uma espécie que apresenta grande potencial para exploração econômica, pela boa aceitação de seus frutos para consumo e pelo alto teor de vitamina C, proporcionalmente quatro vezes maior que os frutos cítricos (NATCHIGAL, 1994; CASAGRANDE JR., 1996; FRANZON, 2004; RIBEIRO, 2007). Além do consumo de seus frutos *in natura*, é uma espécie utilizada com fins medicinais como antidiarreico e antidisentérico (ALICE et al., 1995) e também usado para tratar de doenças das vias urinárias (BOSCOLO; VALLE, 2008).

A presença de compostos fenólicos, originados do metabolismo secundário das plantas e que são sintetizados durante o desenvolvimento normal destas, é essencial ao seu crescimento e reprodução, mas também podem ser produzidos em resposta a condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). A utilização de perfis cromatográficos ou *fingerprints*, como aqueles obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), são importantes para a análise de extratos vegetais uma vez que possibilita obter a representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise (ALAERTS et al., 2007).

Segundo Volpato (2005), vários compostos isolados de plantas consideradas medicinais possuem atividade genotóxica ou citotóxica e mostram relação com a incidência de tumores. O mesmo autor cita como exemplo de toxicidade relacionada a substâncias presentes em vegetais, o efeito tóxico renal causado por espécies que contêm saponinas e terpenos.

O nível de citotoxicidade de uma substância pode ser determinado pelo aumento ou pelo decréscimo do índice mitótico (IM), caracterizado pelo número de células em divisão no ciclo celular em um organismo-teste (LEME et al., 2008), como também pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou a formação de micronúcleos (SOUZA S.A.M. et al. 2005).

Um bioteste usado para identificar prováveis substâncias prejudiciais é o teste de *Allium cepa* L. (cebola), desenvolvido por Levan (1938). Este teste avalia os efeitos de produtos químicos nos cromossomos de plantas, através da análise das células de pontas de raízes de cebola que permaneceram por determinado período diretamente em contato com a substância a ser testada. Em 1985, as primeiras

adaptações do teste foram realizadas por Fiskesjö para que este pudesse ser utilizado no monitoramento ambiental e avaliação de efeitos de misturas complexas. Atualmente o teste de *A. cepa* é bastante utilizado na avaliação de extratos vegetais por pesquisadores como: Fachinetti et al. (2007), Lubini et al. (2008), Tedesco M. et al. (2012) Frescura et al. (2013b) e Kuhn et al. (2015).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; FACHINETTO et al., 2007; BAGANTINI et al., 2007, FRESCURA et al. 2013). Em experimento de mutagenicidade de infusões de *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L., que foi realizado por Teixeira et al. (2003), utilizando células meristemáticas de raízes de cebola, células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos como bioindicadores, os autores observaram os mesmos resultados para os três tipos de células eucarióticas testadas, reforçando a confiabilidade do teste de *A. cepa* em estudos citogenéticos.

Outrossim, o cultivo de plantas medicinais tanto em pequena ou grande escala requer estudos que levem ao conhecimento da espécie, desde a sua correta identificação taxonômica e estudos de caracterização do germoplasma das espécies, principalmente estudos citogenéticos, os quais auxiliam na resolução de problemas taxonômicos, minimizando as dificuldades na identificação e no estabelecimento das relações naturais entre as espécies; fornecem dados importantes para a compreensão da evolução das espécies e são necessários para a realização de um programa de melhoramento genético, através da obtenção de informações sobre a variabilidade genética, problemas de esterilidade e possibilidades de cruzamentos (TEDESCO, 2000).

Estudos meióticos são de suma importância, uma vez que irregularidades encontradas nessa fase, que afetam o pareamento cromossômico, podem levar à esterilidade ou à formação de indivíduos poliploides e aneuploides (PAGLIARINI, 2000). Nesse sentido, a determinação da viabilidade polínica, para Peñaloza (1995) constitui uma medida da fertilidade masculina e é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer. A viabilidade polínica é um dos fatores responsáveis pela seleção de

genótipos para programas de melhoramento, e grãos de pólen viáveis influenciam diretamente o sucesso da fertilização (CABRAL et al., 2013).

O estudo dos grãos de pólen através da sua capacidade de coloração é um dos métodos utilizados para estimar sua viabilidade polínica. Porém, não há na literatura um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico, por isso a importância de se testar mais de um tipo de corante a fim de encontrar o mais adequado para cada espécie. Techio et al. (2006) comparando os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander observou viabilidade do grão de pólen superior a 90% em capim-elefante e milho, independente do corante utilizado.

A grande variação existente em *P. cattleianum*, inclusive aquela relacionada à cor de seus frutos, levam à necessidade de buscar um melhor conhecimento do organismo em estudo, sob vários aspectos, sejam eles ecológicos, genéticos, morfológicos, químicos, entre outros (SOUSA; SOBRAL, 2007).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a existência de efeito genotóxico e antiproliferativo do extrato aquoso das folhas e do suco dos frutos de *P. cattleianum* sobre o ciclo celular de *A. cepa*, por meio da observação de possíveis danos cromossômicos e também da inibição da divisão meristemática das pontas de raízes de cebola submetidas ao suco e aos extratos em diferentes concentrações, servindo como bioindicador de possíveis danos a outros tipos celulares, principalmente células humanas. Bem como determinar os compostos fenólicos presentes nos sucos dos frutos e nos extratos aquosos das folhas de araçá. Além disso, buscou-se avaliar a viabilidade polínica comparando-se dois corantes, a saber, orceína acética 2% e reativo de Alexander, para caracterização do germoplasma de *P. cattleianum*.

## ARTIGO 1

### **Determinação de compostos fenólicos e avaliação do potencial genotóxico e proliferativo dos frutos de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae).<sup>1</sup>**

### **Determination of phenolic compounds and assessment of the genotoxic and proliferative potential of *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) fruits.**

Hister, C.A.L.<sup>a,\*</sup>; Boligon, A.A.<sup>b</sup>; Athayde, M.L.<sup>b</sup>; Tedesco, S.B.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900

<sup>b</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria

\* Autor para correspondência: carmineh@gmail.com

## RESUMO

*Psidium cattleianum* Sabine, também conhecido como araçá, é uma espécie nativa do Brasil, valorizada pelo alto teor de vitamina C em seus frutos. Objetivou-se avaliar a atividade genotóxica e a capacidade proliferativa do suco dos frutos dessa espécie pelo teste de *Allium cepa*, além de determinar os compostos fenólicos presentes no suco. Frutos de três acessos distintos foram coletados e congelados para o preparo dos sucos na concentração de 125 g.L<sup>-1</sup>. Os tratamentos consistiram de: T1 = controle negativo (água destilada); T2 = suco de araçá amarelo (acesso 1); T3 = suco de araçá amarelo (acesso 2); T4 = suco de araçá vermelho (acesso 3); T5 = glifosato 1%. Um total de 8000 mil células por tratamento foram analisadas e os índices mitóticos (IM) foram calculados. Amostras dos sucos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. A análise estatística foi realizada pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram um aumento nos valores dos IM nos tratamentos com os sucos. Também foram encontradas irregularidades na divisão celular, principalmente na metáfase. As análises de CLAE mostraram a predominância de epicatequina no suco de araçá amarelo do T2 e do araçá vermelho do T4. No suco do T3 houve predominância de isoquercitrina. Conclui-se que os frutos de araçá possuem atividade proliferativa, genotóxica e antimitótica sobre a divisão celular de *A. cepa*, o que pode ser extrapolado para outros tipos celulares eucarióticos.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*, araçá, cromatografia líquida, genotoxicidade, índice mitótico.

---

<sup>1</sup> Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Mutation Research. Artigo submetido na versão em inglês.



## ABSTRACT

*Psidium cattleianum* Sabine, also known as strawberry guava, is a Brazilian native species whose fruits are valued for a high level of vitamin C. The purpose of this paper is to investigate the genotoxic activity and proliferative capacity of juices made from strawberry guava fruits by the *Allium cepa* test and determine the phenolic compounds present in the juice. Fruits from three different areas were collected and frozen for subsequent juice preparation at a concentration of 125 g.L<sup>-1</sup>. The treatments consisted of T1: negative control containing distilled water, T2: juice of yellow strawberry guava collected in Arroio Grande, T3: juice of yellow strawberry guava collected in Palma, T4: juice of red strawberry guava collected at UFSM, and T5: positive control containing a 1% glyphosate solution. A total of 8000 cells per treatment were analyzed and the mitotic indices (MI) were calculated. The juice samples were analyzed by high-performance liquid chromatography - HPLC. Statistical analysis was performed using Chi-square and Scott-Knott tests ( $p < 0,05$ ). The results show an increase in the values of IM in the treatments containing strawberry guava juice as well as irregularities in the cell cycle, mainly at metaphase. The analysis of the juices by HPLC shows a predominance of epicatechin in T2 and T4, and isoquercitrin in T3. One concluded that strawberry guava has proliferative, genotoxic and antimitotic activity upon the cell cycle of *A. cepa*, and possibly on other eukaryotic cells.

**Keywords:** *Allium cepa*, strawberry guava, liquid chromatography, genotoxicity, mitotic index.

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores diversidades de plantas vasculares do mundo, somando aproximadamente 55.000 espécies de plantas superiores, distribuídas em cinco domínios fitogeográficos principais: Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia, Caatinga e Campos Sulinos [1]. Apesar dessa potencialidade, há limitações na domesticação de espécies nativas que limitam a ampla utilização e consumo de seus frutos e outros produtos derivados potencialmente relevantes [2].

A ingestão de compostos como antocianinas e carotenoides, pigmentos naturais que são responsáveis pela cor dos frutos, tem sido relacionada à redução de várias doenças crônico-degenerativas, justamente pela sua ação antioxidante terapêutica, biológica e preventiva [3]. Além da grande quantidade de plantas cujos frutos apresentam propriedades preventivas antioxidantes, há uma infinidade de frutíferas que se prestam ao fim medicinal. As plantas medicinais, tanto em nível local como mundial, são utilizadas na medicina popular na forma de chás, assim como diversas frutas são consumidas por terem propriedades medicinais, sendo

imprescindível o estudo dessas plantas a fim de minimizar os efeitos negativos sobre a saúde da população.

Os componentes da biodiversidade necessitam maiores estudos em seus ecossistemas naturais, visto que uma pequena parte de seus princípios ativos foi adequadamente estudada e cujos benefícios permanecem desconhecidos [4].

Dentre as plantas que requerem atenção especial está *Psidium cattleianum* Sabine. É uma espécie de Mata Atlântica, pertencente à família Myrtaceae, com altura de três a seis metros, ocorrendo naturalmente desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Popularmente é conhecido por diversos nomes: araçá, araçá-vermelho, araçá-rosa, araçá-amarelo, araçá-de-coroa [5]. Uma peculiaridade desta espécie, é que ela apresenta plantas com frutos de coloração amarela e plantas com frutos de coloração vermelha. Sousa e Sobral [6] em seu trabalho não reconheceram os dois grupos morfológicos como status taxonômico, e designaram morfotipo de frutos amarelos (ou morfotipo amarelo) e morfotipo de frutos vermelhos (ou morfotipo vermelho). Além da coloração dos frutos, os dois morfotipos apresentam diferenças quanto ao tamanho e constituintes químicos das folhas [7], hábito/porte e região de ocorrência [6].

O fruto é consumido na forma *in natura*, em sucos, geleias e sorvetes [8]. Casagrande Júnior [9] afirma que o araçazeiro apresenta grande potencial para exploração econômica, em virtude das características dos seus frutos, da boa aceitação para consumo e pelo teor de vitamina C, proporcionalmente quatro vezes maior que os frutos cítricos. Além do aproveitamento dos frutos e da madeira, utilizam-se também as raízes, cascas e folhas no preparo de infusões, amplamente difundidos na medicina popular [10]. No entanto, o consumo indiscriminado de chás ou derivados, como frutos de plantas consideradas medicinais, merece uma atenção especial, devido ao desconhecimento a respeito de seus constituintes químicos, que podem, muitas vezes, causar mais danos à saúde do que benefícios. Segundo Volpato [11], vários compostos isolados de plantas consideradas medicinais possuem atividade genotóxica ou citotóxica e mostram relação com a incidência de tumores. Como exemplo de toxicidade relacionada a substâncias presentes em vegetais, pode ser citado o efeito tóxico renal causado por espécies que contêm saponinas e terpenos.

De acordo com Varanda [12] substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem sua interação com os ácidos

nucleicos, e os ensaios para detectar tais substâncias permitem identificar riscos potenciais aos seres humanos. Como bioensaios vegetais são mais sensíveis para detectar genotoxicidade de agentes ambientais, podem servir como um primeiro alerta para a presença de riscos ambientais [13]. Agentes mutagênicos podem ser detectados citologicamente pela inibição celular; interrupção na metáfase; indução de aberrações cromossômicas, numérica e estrutural, que vão desde a fragmentação cromossômica à desorganização do fuso mitótico, e, conseqüentemente, comprometendo todas as fases seguintes da mitose [14].

Um bioteste usado para identificar prováveis substâncias prejudiciais, tanto para os organismos vivos como para o ambiente como um todo, é o teste de *Allium cepa* L. (cebola), desenvolvido por Levan [15]. Este teste mostra os efeitos de produtos químicos nos cromossomos de plantas, através da análise das pontas de raízes de cebola. Em 1985, as primeiras adaptações do teste foram realizadas por Fiskesjö [16] para que este pudesse ser utilizado no monitoramento ambiental e avaliação de efeitos de misturas complexas.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais [17-20]. Em experimento de mutagenicidade de infusões de *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L., que foi realizado por Teixeira et al. [21], utilizando células meristemáticas de raízes de cebola, células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos como bioindicadores, os autores observaram os mesmos resultados para os três tipos de células eucarióticas testadas, reforçando a confiabilidade do teste de *A. cepa* em estudos citogenéticos.

Este trabalho objetivou determinar os compostos fenólicos presentes no suco dos frutos de *P. cattleianum*, assim como analisar a existência de atividade genotóxica e proliferativa por meio da observação de possíveis danos cromossômicos e também da inibição ou incrementação da divisão meristemática das pontas de raízes de *A. cepa*, servindo como indicativo de possíveis danos a outros tipos celulares, principalmente células humanas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de material botânico**

Os frutos de três acessos diferentes foram coletados nos meses de fevereiro e março de 2014. Foram coletados dois acessos de frutos amarelos, um no Distrito de Arroio Grande (29°40'27.7"S 53°38'19.9"W) – Santa Maria/RS) e outro no Distrito de Palma (29°42'2.0"S 53°37'55.5"W), e um acesso de frutos vermelhos no Campus da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS (29°43'20.0"S 53°43'13.9"W). O material testemunho de cada acesso coletado foi devidamente identificado, segundo normas usuais em taxonomia [22] e incorporado ao herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) do Departamento de Biologia da UFSM, sob os números 15.064, 15.065 e 15.063, respectivamente.

### **Preparo dos sucos**

Os frutos frescos foram lavados e cortados em pedaços. Após pesou-se 25 gramas de frutos de cada acesso, incluindo casca e sementes, e as amostras foram colocadas no freezer para congelamento. Optou-se pelo congelamento dos frutos pois, de acordo com Drehmer e Amarante [23], o araçá apresenta elevada perecibilidade em condições de temperatura ambiente, recomendando o imediato armazenamento dos frutos a temperaturas próximas de 0°C, visando prolongar a sua conservação.

Após 48 horas, o suco foi preparado em liquidificador (potência 600W), misturando-se os frutos congelados juntamente com 200 mililitros de água destilada durante 1 minuto, em velocidade 3. A seguir a mistura foi coada e colocada em copos plásticos de 50 ml onde os bulbos de cebola previamente enraizados em água destilada permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente.

### **Análise dos sucos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)**

Uma amostra de cada suco, na concentração de 125 g.L<sup>-1</sup>, foi separada para a realização de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de

diodos (CLAE-DAD), no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

*Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais*

Todos os reagentes químicos foram de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Rutina, epicatequina, catequina, isoquercetina, quercetina, quercitrina e canferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) e auto injetor Shimadzu (SIL-20A), equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) ligadas a um desgaseificador (20A5 DGU) com um integrador (CBM 20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e software (LC solution SP1 1.22).

*Quantificação dos compostos por meio de CLAE-DAD*

As análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa sob condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro 5  $\mu\text{m}$ , a fase móvel utilizada foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi: 5% (B) durante 2 min, 25% (B) até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 min, seguindo o método descrito por Peroza [24] com pequenas modificações.

Os sucos de araçá foram analisados a uma concentração de 125 mg/mL. O fluxo usado foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção de 40  $\mu\text{L}$  e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para o ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogênico, e 365 nm para rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e canferol. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultrassom antes da utilização. As soluções de referência foram preparadas na fase móvel para CLAE nas concentrações de 0,050-250 mg/mL para rutina quercetina, quercitrina, isoquercitrina, canferol, catequina e epicatequina; e 0,030-450 mg/mL para ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os dos padrões de referência e por espectros de DAD

(200 a 500 nm). A curva de calibração para o ácido gálico foi:  $Y = 12739x + 1186,9$  ( $r = 0,9994$ ); ácido clorogênico:  $Y = 11976x + 1206,5$  ( $r = 0,9997$ ), ácido cafeico:  $Y = 12573x + 1270,3$  ( $r = 0,9996$ ), ácido elágico:  $Y = 13062x + 1269,3$  ( $r = 0,9990$ ), catequina:  $Y = 11968x + 1347,1$  ( $r = 0,9995$ ), epicatequina:  $Y = 12763x + 1269,5$  ( $r = 0,9993$ ), quercetina:  $Y = 13184x + 1256,1$  ( $r = 0,9999$ ), isoquercetina:  $Y = 11985x + 1359,7$  ( $r = 0,9996$ ), quercitrina:  $Y = 13065x + 1249,6$  ( $r = 0,9993$ ), rutina:  $Y = 13583x + 1267,5$  ( $r = 0,9998$ ) e canferol:  $Y = 13423x + 1153,2$  ( $r = 0,9998$ ).

Todas as operações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas, e a inclinação, usando três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como  $3.3$  e  $10 \sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta, e  $S$  é a inclinação da curva de calibração [25].

### **Tratamentos e critérios de análise**

As células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (cebola,  $2n = 16$ ) foram utilizadas como sistema teste para avaliar as alterações cromossômicas morfológicas e estruturais e determinar os índices mitóticos. As escamas secas sobre as cebolas foram removidas com cuidado, sem danificar o anel de raízes. A seguir, grupos de quatro bulbos, cada um correspondendo a um tratamento, foram colocados para enraizar em água destilada. Após o enraizamento, um grupo permaneceu em água destilada, sendo o controle negativo, outro foi colocado em solução de glifosato a 1% (controle positivo), e os demais foram transferidos para as soluções tratamento com os diferentes sucos, por 24 horas.

A avaliação da genotoxicidade do suco dos frutos *P. cattleianum* contou com os seguintes tratamentos, com quatro bulbos (repetições) de cebola cada, conforme descrito a seguir:

- Tratamento 1 = controle negativo (água destilada);
- Tratamento 2 = Suco de frutos amarelos ( $125 \text{ g.L}^{-1}$ ) – Distrito de Arroio Grande (DAG), Santa Maria, Rio Grande do Sul;
- Tratamento 3 = Suco de frutos amarelos ( $125 \text{ g.L}^{-1}$ ) – Distrito de Palma (DP), Santa Maria, Rio Grande do Sul;

- Tratamento 4 = Suco de frutos vermelhos ( $125 \text{ g.L}^{-1}$ ) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul;
- Tratamento 5 = controle positivo (solução de glifosato a 1%)

Após esse período de aplicação dos tratamentos, as radículas dos bulbos de cebola (incluindo os controles) com aproximadamente 5 mm foram coletadas, fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas e armazenadas em etanol 70% sob refrigeração para posterior análise do ciclo celular. Para a confecção das lâminas, as pontas das raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N por 5 minutos, que após foram lavadas em água destilada. Com auxílio de um microscópio estereoscópio, a coifa das raízes foi retirada, a região meristemática corada comorceína acética 2% e esmagada com auxílio de um bastão de vidro. Sobre o material foi colocada uma lamínula.

A análise das lâminas foi realizada ao microscópio óptico, sendo que para cada bulbo foram utilizadas duas repetições, ou seja, duas lâminas. Mil células por lâmina foram analisadas, totalizando 2000 células por bulbo, e 8000 células por tratamento. Os valores dos índices mitóticos (IM) foram calculados com base na porcentagem de células em divisão (razão do número de células em divisão pelo número total de células analisadas, multiplicado por 100). Além das fases da divisão celular, observou-se possíveis irregularidades, como: quebras cromossômicas, pontes, cromossomos perdidos ou atrasados e presença de micronúcleos.

### **Análise Estatística**

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Os valores dos índices mitóticos e das alterações cromossômicas foram comparados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa Bioestat 5.0 [26]. As médias dos compostos fenólicos resultantes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram comparadas utilizando-se o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa Assistat®, versão beta 7.7.

## RESULTADOS

### Análise da mitose

São apresentados na Tabela 1 os resultados da análise do ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa*, mostrando todas as fases da divisão celular e o número de células encontradas em cada uma delas, bem como os valores dos índices mitóticos de cada tratamento.

Tabela 1 – Número de células de *Allium cepa* analisadas nos diferentes tratamentos e seus respectivos índices mitóticos (IM), incluindo células em interfase, em divisão celular e com irregularidades.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Células analisadas</b>	8000	8000	8000	8000	8000
<b>Interfase</b>	7757	7611	7545	7561	7757
<b>Prófase</b>	101	201	205	206	102
<b>Metáfase</b>	65	19	24	55	51
<b>Anáfase</b>	37	7	21	11	12
<b>Telófase</b>	40	29	49	35	30
<b>Células com irregularidades</b>	0	133	156	132	48
<b>Índice mitótico - IM (%)</b>	3,04% a*	4,86% b	5,69% c	5,49% c	3,04% a

T1 = controle negativo (água destilada); T2 = suco de araçá amarelo 125 g.L<sup>-1</sup> (DAG – Distrito de Arroio Grande); T3 = suco de araçá amarelo 125 g.L<sup>-1</sup> (DP – Distrito de Palma); T4 = suco de araçá vermelho 125 g.L<sup>-1</sup> (UFSM – Universidade Federal de Santa Maria); T5 = controle positivo (glifosato 1%). \*IM seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado a nível de 5% de significância.

Um resultado inesperado é o grande número de irregularidades encontradas nas células de pontas de raízes de *A. cepa* submetidas aos tratamentos com o suco de frutos de *P. cattleianum*, pois se tratam de frutos que são consumidos *in natura* pela população. Foram encontradas mais irregularidades nos tratamentos com suco do que no controle positivo.

A análise das células revelou a presença de um grande número de irregularidades durante a todo o ciclo celular, como por exemplo: quebras



cromossômicas, cromossomos perdidos, uma célula com micronúcleo (Fig. 1a), pontes (Fig 1b) e células em processo de apoptose (Fig. 1c). Entretanto, a maioria das irregularidades foi encontrada na metáfase, na qual os cromossomos foram observados espalhados pela célula (Fig. 1d, 1e, 1f e 1g) e não organizados na placa equatorial como deve acontecer durante a divisão celular normal ou regular, resultando em metáfases desorganizadas, mas todas iguais, considerando que o efeito do suco levou a interrupção da divisão em metáfase mitótica, possibilitando inclusive a contagem dos cromossomos.

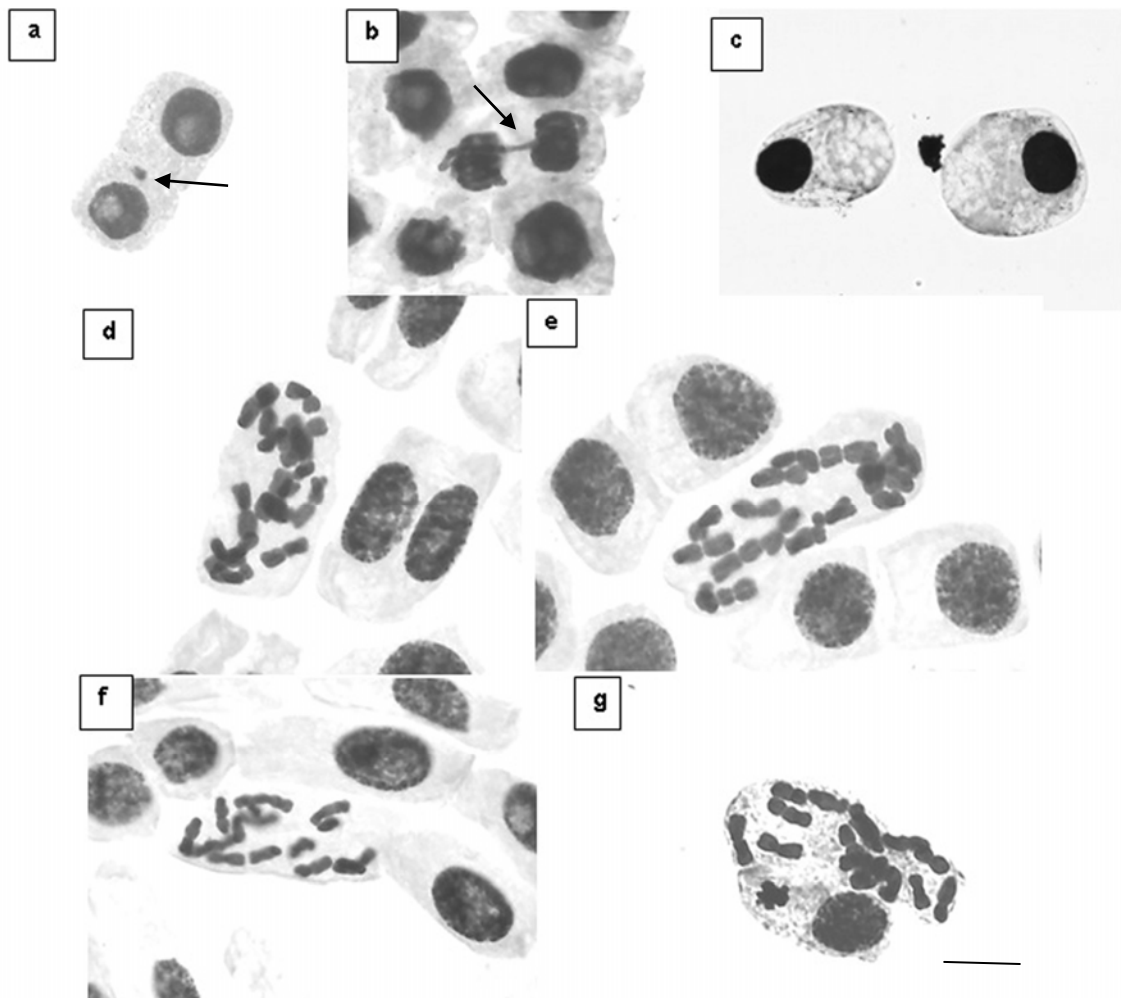


Figura 1 – Irregularidades encontradas nas células de *Allium cepa* submetidas aos diversos tratamentos: a) seta mostrando micronúcleo no tratamento com suco de araçá amarelo (acesso de Distrito de Palma - T3); b) seta indicando ponte na telófase no tratamento com suco de araçá vermelho (acesso UFSM - T4); c) células em apoptose no tratamento com glifosato 1% (T5). Células apresentando metáfases irregulares: d,e) tratamento com suco de araçá amarelo (acesso Distrito de Arroio Grande - T2); f) tratamento com suco de araçá amarelo (acesso de Distrito de Palma - T3); g) tratamento com suco de araçá vermelho (acesso UFSM - T4). Escala: 10 $\mu$ m.

A Tabela 2, mostrada a seguir, detalha o tipo e o número de alterações cromossômicas observadas durante o ciclo celular de células da região meristemática de raízes de cebola.

Tabela 2 – Número e tipo de irregularidades encontradas nas células de *Allium cepa* submetidas aos diversos tratamentos, e média de células com alterações.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Total de células em divisão</b>	243	389	455	439	243
<b>Metáfase irregular (desorganizada)</b>	0	122	139	128	0
<b>Quebra cromossômica/ Cromossomo perdido</b>	0	11	12	2	16
<b>Pontes em anáfase e telófase</b>	0	0	4	1	13
<b>Células em apoptose</b>	0	0	0	0	19
<b>Micronúcleo</b>	0	0	0	1	0
<b>Células com alterações (%)</b>	0% a*	34,2% d	34,1% d	30,1% c	19,8% b

T1 = controle negativo (água destilada); T2 = suco de araçá amarelo 125 g.L<sup>-1</sup> (DAG – Distrito de Arroio Grande); T3 = suco de araçá amarelo 125 g.L<sup>-1</sup> (DP – Distrito de Palma); T4 = suco de araçá vermelho 125 g.L<sup>-1</sup> (UFSM – Universidade Federal de Santa Maria); T5 = controle positivo (glifosato 1%). \*Números seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado a nível de 5% de significância.

### Análise da CLAE

Os cromatogramas do suco de *P. cattleianum* revelaram a presença de ácido gálico (tR = 8,71 min; pico 1), catequina (tR = 16,93 min; pico 2), ácido clorogênico (tR = 16,93 min; pico 3), ácido cafeico (tR = 23,46; pico 4), ácido elágico (tR = 16,93 min; pico 5), epicatequina (tR = 16,93 min; pico 6), rutina (tR = 37,51 min; pico 7), quercitrina (tR = 16,93 min; pico 8), isoquercitrina (tR = 48,95 min; pico 9), quercetina (tR = 48,95 min; pico 10) e canferol (tR = 48,95 min; pico 11). As figuras 2a, 2b e 2c mostram o perfil cromatográfico do suco dos frutos de *P. cattleianum* nos três acessos analisados.

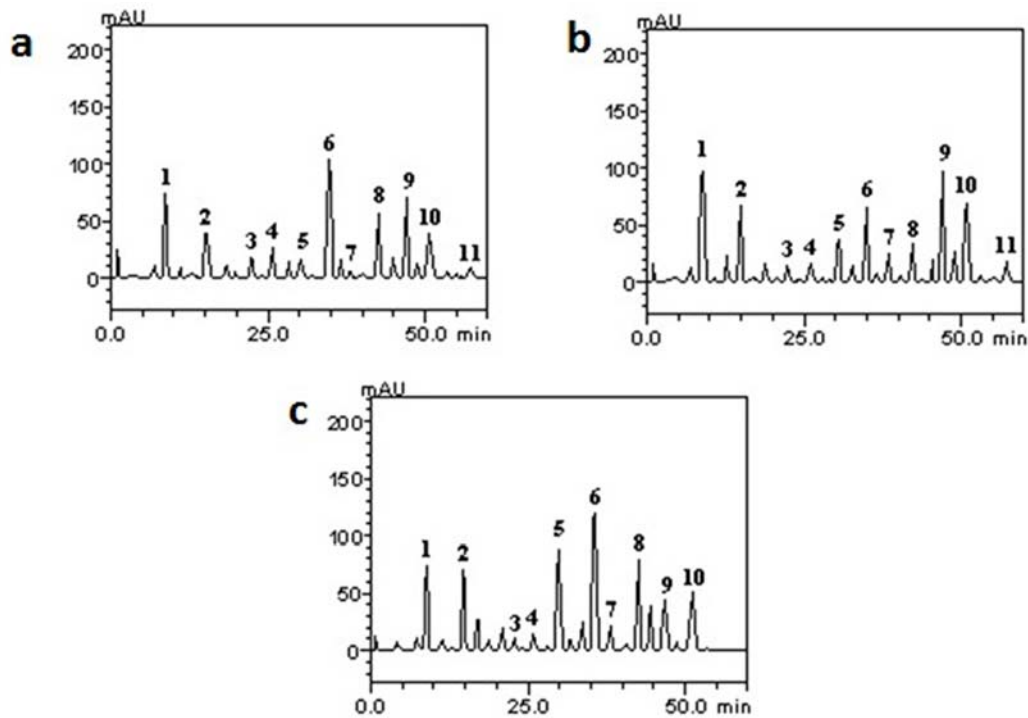


Figura 2 – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência do suco dos frutos de *Psidium cattleianum* Sabine: a) acesso 1 – Distrito de Arroio Grande (DAG); b) acesso 2 – Distrito de Palma (DP); c) acesso 3 – UFSM; detecção UV a 327 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), isoquercitrina (pico 9), quercitina (10) e canferol (pico 11).

No perfil cromatográfico é possível observar que o composto mais representativo para o suco dos acessos de Arroio Grande (DAG) e UFSM foi a epicatequina. Por outro lado, a isoquercitrina foi o componente em maior quantidade no suco do acesso de Palma (DP), não diferindo significativamente do segundo composto, o ácido gálico. A rutina foi a substância menos presente no suco do acesso de DAG, enquanto que nos demais, o ácido clorogênico foi o composto com menor representatividade. A Tabela 3 confirma os dados verificados no perfil e mostra a quantidade média de cada um dos compostos fenólicos presentes no suco dos frutos de araçá, assim como a quantidade total de compostos em cada um dos três acessos coletados, obtidos por cromatografia (CLAE).

Tabela 3 – Compostos fenólicos e flavonoides em frutos de *Psidium cattleianum* Sabine de três acessos distintos, obtidos por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE).

Compostos	Suco de araçá amarelo (DAG)	Suco de araçá amarelo (DP)	Suco de araçá vermelho (UFMS)	LOD	LOQ
	mg.g <sup>-1</sup>			µg/mL	
Ácido gálico	0.826 b*	1.206 a	0.906 c	0.012	0.030
Catequina	0.456 d	0.876 b	0.936 c	0.019	0.062
Ácido clorogênico	0.173 e	0.166 e	0.133 g	0.031	0.101
Ácido cafeico	0.213 e	0.220 d	0.206 f	0.025	0.083
Ácido elágico	0.170 e	0.393 c	1.146 b	0.008	0.027
Epicatequina	1.146 a	0.846 b	1.283 a	0.027	0.089
Rutina	0.073 f	0.226 d	0.213 f	0.023	0.075
Quercitrina	0.710 c	0.373 c	1.126 b	0.014	0.045
Isoquercitrina	0.820 b	1.216 a	0.680 e	0.009	0.029
Quercetina	0.483 d	0.856 b	0.720 d	0.016	0.053
Canferol	0.146 e	0.220 d	-	0.022	0.073
<b>TOTAL</b>	<b>5,216</b>	<b>6,598</b>	<b>7,349</b>		

DAG – Distrito de Arroio Grande; DP – Distrito de Palma; UFMS – Universidade Federal de Santa Maria. Resultados são expressos como média ± desvios padrões (SD) de três determinações. LOD é o limite de detecção e LOQ é o limite de quantificação. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A partir dos dados apresentados na Tabela 1 é possível verificar a presença de células com irregularidades no controle positivo, o que não ocorreu no controle negativo em água. Além disso, houve um pequeno aumento de células em divisão celular (aumento dos valores dos índices mitóticos) nos tratamentos com o suco dos frutos, sendo que os tratamentos com suco de araçá amarelo do acesso do Distrito de Palma – DP (T3), cujo IM é 5,69%, e com suco de araçá vermelho no T4 (IM = 5,49%) diferiram significativamente dos controles negativo e positivo (IM = 3,04%). Por outro lado o tratamento com suco de frutos amarelos do acesso do Distrito de Arroio Grande – DAG (T2) o IM = 4,86% diferiu significativamente dos tratamentos T3 e T4, mas não diferiu dos controles. Esta diferença pode ser atribuída à variabilidade genética entre os acessos, bem como aos diferentes fatores

edafoclimáticos a que os acessos estão expostos como: ontogenia, altitude, temperatura, precipitação e estresse mecânico, uma vez que o suco de um acesso de frutos amarelos (DP – T3) não diferiu do suco de frutos vermelhos (UFSM – T4), mas estes dois diferiram do suco de frutos amarelos de outro acesso (DAG – T2). Talvez essa diferença significativa no valor do índice mitótico apresentada pelo suco no tratamento T2 em relação aos demais (tratamentos T3 e T4) pode ser parcialmente explicada pelo fato de que o suco do acesso utilizado no tratamento T2 apresentou menos compostos fenólicos totais ( $5,216 \text{ mg.g}^{-1}$ ) que os sucos dos outros dois acessos.

Estes resultados vão de encontro aos resultados encontrados por Medina [2], em que extratos de araçá (sem sementes) reduziram significativamente a proliferação de células cancerosas de mama e de cólon, independentemente do genótipo testado e do solvente utilizado para extração (água e acetona). O mesmo autor também concluiu que os extratos de araçá possuem efeito antimicrobiano sobre a bactéria patogênica *Salmonella enteritidis*.

É importante notar que a divisão celular de materiais vegetais tais como raízes crescendo *in vivo* continua ininterruptamente sob condições normais. Ademais, a inibição da formação do fuso e conseqüente interrupção da divisão celular podem ser influenciadas por meio de agentes antimitóticos tais como a hidroxiquinoleína, a colchicina ou o paradiclorobenzeno. Estudos com *Allium sativum*, realizado por Yüzbaşıoğlu e Ünal [27], mostraram que células mitóticas com cromossomos bem espalhados foram obtidas com pré-tratamento das raízes com colchicina. Ekong et al. [28] realizaram a comparação entre três pré-tratamentos com paradiclorobenzeno, hidroxiquinoleína e colchicina em raízes de *Allium cepa* e mostraram que todos foram eficazes para obtenção de metáfases pela inibição do fuso mitótico. Esse resultado pode ser obtido também por meio da conhecida técnica de pré-tratamento a frio para obtenção de metáfases mitóticas, a qual consiste em realizar o corte das raízes das plantas, colocando-as em água em recipientes cobertos de gelo e mantidos em isopor na geladeira em temperatura constante por um tempo determinado, que pode variar de acordo com a espécie.

Considerando as circunstâncias em que o teste da *Allium cepa* foi realizado, é possível dizer que os tratamentos com o suco dos frutos de araçá tiveram atuação semelhante a dos inibidores antimitóticos mencionados acima. Como mostram os resultados do presente estudo, os cromossomos se encontravam em metáfases

mitóticas apropriadas para contagem. Até onde entendemos, esse resultado não pode ser atribuído ao fato de os sucos usados nos tratamentos terem sido feitos com frutos previamente congelados, uma vez que o teste *Allium cepa* é realizado em temperatura ambiente, e, portanto, os sucos não poderiam permanecer em temperatura baixa e constante.

Diversos agentes antimitóticos, como os citados anteriormente são utilizados na área de citogenética de plantas para conseguir a inibição da formação do fuso mitótico. Sua ação durante o processo de pré-tratamento permite a obtenção de inúmeras células em metáfases mitóticas com bom espalhamento dos cromossomos para que seja possível realizar a contagem dos mesmos. O tempo necessário para inibição da divisão celular e consequente obtenção de metáfases mitóticas com bom espalhamento cromossômico é variável nas distintas espécies.

Ortiz et al. [29] demonstraram que para espécies nativas do gênero *Arachis* foram necessárias 3 horas de pré-tratamento com solução 0,002 M de 8-hidroxiquinoleína, à temperatura ambiente para que fosse possível conseguir células apropriadas para contagem dos cromossomos. Em *Achyrocline satureioides*, planta medicinal nativa do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, Pereira et al. [30], realizaram a contagem dos cromossomos pela primeira vez e utilizaram o paradiclorobenzeno como pré-tratamento por 5 horas a temperatura ambiente. Já Fachinetti e Tedesco [31] utilizaram o paradiclorobenzeno a 15% por 10 horas a temperatura ambiente para obtenção de metáfases em *Hyptis mutabilis*, enquanto Daviña et al. [32] realizaram pré-tratamento com 1-bromonaftaleno de 2-3 horas, à temperatura ambiente, para que fosse possível a obtenção de metáfases mitóticas adequadas em orquídeas.

Portanto, acredita-se que no suco dos frutos de araçá está presente uma substância que tem efeito antimitótico similar ao da colchicina que inclusive é mutagênica e leva ao dobramento dos cromossomos. Nas figuras 1d, 1e, 1f, 1g é possível observar o efeito antimitótico provocado pelos distintos sucos de araçá, provavelmente pela inibição da formação dos fusos mitóticos, não permitindo que os cromossomos se organizassem na placa equatorial para posteriormente serem deslocados para os polos opostos da célula durante a anáfase. Considerando que a temperatura dos sucos não foi a responsável pelo efeito antimitótico, acredita-se que tal efeito tenha sido causado pela ação dos compostos presentes no suco de araçá, caracterizando um efeito citotóxico sobre as células de raízes de cebola. Talvez

algum composto presente na polpa ou na casca dos frutos possa ter essa ação antimutagênica ou ainda a sinergia entre os compostos presentes no suco, uma vez que Medina et al. (2011) fez experimentos com frutos de *P. cattleianum* sem sementes e verificou atividade antiproliferativa frente a células humanas de câncer de mama e de cólon.

Os resultados das análises dos sucos através de CLAE mostraram a predominância de epicatequina (pico 6) seguido de ácido gálico (pico 1) e isoquercitrina (pico 9) no suco de araçá amarelo do tratamento T2. A epicatequina também é o componente em maior quantidade no suco do araçá vermelho do T4, porém é seguida de ácido elágico (pico 5) e quercitina (pico 8). No suco de frutos amarelos do T3 houve predominância de isoquercitrina, seguido de ácido gálico. Mostrando que há uma diferença na composição química dos frutos amarelos e vermelhos, assim como Biegelmeyer [33] em seu estudo encontrou em araçá vermelho maior quantidade de polifenóis e flavonoides do que em araçá amarelo. Em estudos realizados por Medina et al. [2], frutos de araçá apresentaram níveis elevados de compostos fenólicos (acima de  $768 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  na polpa de frutos frescos), particularmente (-)-epicatequina (acima de  $2,7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), que foram, em geral, mais eficientemente extraídos com acetona do que com água.

Compostos fenólicos, tais como flavonoides (quercitrina, isoquercitrina) tem como propriedade benéfica o sequestro de radicais livres [34]. Outro flavonoide natural, a epicatequina, possui propriedade antioxidante e inibidora do processo de carcinogênese [35]. A presença do flavonoide quercitrina foi relatada em *Solidago microglossa* DC. [36-38], o qual confere à espécie, de acordo com Smolarek et al. [39], atividades anti-inflamatória e analgésica. A abundância de compostos fenólicos em sucos dos frutos de araçá foi positivamente correlacionada com ação antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* [2], assim como atividade antioxidante e antiproliferativa. McCook-Russell et al. [40] também relataram atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de frutos de araçá, porém sobre *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Desoti [41] afirma que *P. cattleianum* poderia ser uma fonte de drogas antibacterianas, especialmente contra bactérias Gram positivas e leveduras. Luximon-Ramma [42] observou alta capacidade antioxidante nos frutos de *P. cattleianum*, em termos de fenóis totais, proantocianidinas, flavonoides e teor de vitamina C.

A grande quantidade de irregularidades encontradas durante o ciclo celular de *A. cepa*, principalmente nas células em metáfase, está relacionada a algum componente presente nos sucos, não sendo possível afirmar qual exatamente ou ainda ao sinergismo existente entre os compostos, que parece inibir a formação das fibras do fuso mitótico, impedindo que a divisão prossiga de maneira correta. Estudos com drogas que inibem a formação do fuso mitótico têm provado serem bem sucedidas em tratamentos quimioterápicos contra células cancerígenas [43]. Estudos em *Allium cepa* realizados por Oyeyemia e Bakarea [44] mostraram que extratos aquosos de *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. e *Luffa cylindrical* L. são inibidores do fuso. Isto pode ser responsável pelo sucesso aclamado dessas plantas no tratamento tradicional contra o câncer.

Em uma população como a brasileira onde a maioria tem baixo acesso a medicamentos, o reconhecimento científico da ação das plantas medicinais e seu uso como uma terapia alternativa apresentaria vantagens, como o fácil acesso e baixo custo, diminuição de efeitos adversos, e principalmente evitando ou diminuindo os riscos de intoxicações por uso inadequado [45].

Ao analisar os compostos fenólicos presentes nos frutos de araçá não se tem conhecimento de algum desses compostos tenha ação comprovada sobre a interrupção da divisão celular, resultando em grande número de células metafásicas com espalhamento dos cromossomos. Esse estudo mostrou resultados surpreendentes e nos apresenta uma nova maneira de obtenção de células em metáfase mitóticas, as quais podem ser obtidas sem o uso de produtos químicos. A preocupação desses resultados refere-se à saúde humana, sendo que a população consome os frutos de araçá *in natura* e também faz uso dos mesmos a partir de polpas congeladas. Faz-se necessário realizar mais estudos para indicar os compostos responsáveis pela ação antimitótica apresentada pelos frutos de *P. cattleianum* sobre a divisão celular de *A. cepa*.

Conclui-se que os frutos de *P. cattleianum* possuem atividade proliferativa e genotóxica sobre a divisão celular de *Allium cepa*, o que pode ser extrapolado para outros tipos celulares eucarióticos. O suco dos frutos de araçá também pode ser utilizado como pré-tratamento para obtenção de células em metafases mitóticas na área de citogenética vegetal devido à sua ação antimitótica. A cromatografia líquida de alta eficiência revelou que a epicatequina foi o composto fenólico mais abundante em dois acessos (DAG e UFSM) e a isoquercitrina foi predominante no acesso DP.



Recomenda-se cautela em relação ao uso indiscriminado de araçá na forma de suco de seus frutos.

## REFERÊNCIAS

- [1] P. Fiaschi, J. Pirani, Review of plant biogeographic studies in Brazil, *J Syst and Evol* 47 (2009) 477–496.
- [2] A.L. Medina, A.P.S. Haas, F.C. Chaves, M. Salvador, R.C. Zambiasi, W.P. da Silva, L. Nora, C.V. Rombaldi, Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells, *Food Chem* 128 (2011) 916–922. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.119
- [3] W. Stahl, H. Sies, Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1740 (2005) 101-107. DOI:10.1016/j.bbadis.2004.12.006
- [4] M.P. Guerra, R.O. Nodari, Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos, in: C.M.O. Simões et al. (Org.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, six ed., Editora da UFRGS, Porto Alegre; Editora da UFSC, Florianópolis, 2007, p. 13-28.
- [5] H. Lorenzi, *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Nova Odessa, Plantarum, 1992, 352p.
- [6] L.P. Sousa, M.E.G. Sobral, Morfotipos do Araçazeiro, *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) no Estado do Paraná, in: J.H. Pedrosa-Macedo, A. DalMolin, C.W. Smith (Orgs.), *O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico*, Curitiba, FUPEF, 2007, p. 19-28.
- [7] M.X.S. Varella, C.A.M. Santos, M.R. Duarte, Caracteres morfoanatômicos e constituintes químicos de folha de araçazeiro-morfotipos de fruto vermelho e amarelo, in: J.H. Pedrosa-Macedo, A. DalMolin, C.W. Smith (Orgs.), *O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico*, Curitiba, FUPEF, 2007, p. 39-45.
- [8] C.W.I. Haminiuk, M.R. Sierakowski, J.R.M.B. Vidal, M.L. Masson, Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (*Psidium cattleianum* Sabine), *LWT - Food Sci Technol* 39 (2006) 426-430.
- [9] J.G. Casagrande Júnior, J.A. Voltolini, A. Hoffmann, J.C. Fachinello, Efeito de materiais orgânicos no crescimento de mudas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), *Rev Bras de Agrocienc* 2 (1996) 187-191.
- [10] A.L. Medina, Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*). 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

- [11] A.M.M. Volpato, Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- [12] E.A. Varanda, Atividade mutagênica de plantas medicinais, *Rev Cienc Farm Básica Apl* 27 (2006) 1-7.
- [13] J. Katnoria, A. Nagpal, R. Bhardwaj, Genotoxic potential of soil of Amritsar using chromosomal aberration assay in *Allium cepa*, 15th International Chromosome Conference, *Chromosome Res* 12 (2004) 76–77.
- [14] S.B. Tedesco, H.D. Laughinghouse IV, Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, *Environ Contam* (2012), Dr. Jatin Srivastava (Ed.), Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test> 02/10/2014
- [15] A. Levan, The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*, *Hered* XXIV (1938) 471-486. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/pdf> 02/10/2014
- [16] G. Fiskesjö, The *Allium test* as a standard in environmental monitoring, *Hered* 102 (1985) 99-112. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x/pdf> 02/10/2014.
- [17] G.L. Cabrera, D.M.G. Rodriguez, Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays, *Mutat Res* 426 (1999) 211-214.
- [18] J.M. Fachinetto, M.D. Bagatini, J. Durigon, A.C.F. Silva, S.B. Tedesco, Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, *Rev Bras Farmacogn* 17 (2007) 49-54.
- [19] M.D. Bagatini, A.C.F. Silva, S.B. Tedesco, Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, *Rev Bras de Farmacogn* 17 (2007) 444-447.
- [20] V.D. Frescura, A.W. Kuhn, H.D. Laughinghouse IV, F.T. Nicoloso, S.J. Lopes, S.B. Tedesco, Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (Rubiaceae) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (Brassicaceae), *Caryologia* 66 (2013) 138-144. DOI: 10.1080/00087114.2013.821832
- [21] R.O. Teixeira, M.L. Camparoto, M.S. Mantovani, V.E.P. Vicentini, Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays, *Genet Mol Biol* 26 (2003) 551-555.
- [22] S.A. Mori, A.M. Silva, G. Lisboa, L. Coradim, Manual de manejo do herbário fanerogâmico, two ed., CEPLAC, Ilhéus, 1989, 104p.

- [23] A.M.F. Drehmer, C.V.T. Amarante, Conservação pós-colheita de frutos de araçá-vermelho em função do estágio de maturação e temperatura de armazenamento, *Rev Bras Frutic* 30 (2008) 322-326.
- [24] L.R. Peroza, A. Busanello, C.Q. Leal, J. Ropke, A.A. Boligon, D. Meinerz, M. Libardoni, M.L. Athayde, R. Fachinetto, *Bauhinia forficata* prevents vacuuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro, *Neurochem Res* 38 (2013) 789–796. DOI: 10.1007/s11064-013-0981-8
- [25] A.A. Boligon, T.F. Kubiça, D.N. Mario, T.F. Brum, M. Piana, R. Weinblen, Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts, *Acta Physiol Plant* 35 (2013) 2229-2239. DOI: 10.1007/s11738-013-1259-0
- [26] M. Ayres, M. Ayres Júnior, D.L. Ayres, A.A. Santos, *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*, Ong Mamiraua, Belém, 2007, 364p.
- [27] D. Yüzbaşıoğlu, F. Ünal, Karyotyping, C- and nor banding of *Allium sativum* L. (Liliaceae) cultivated in Turkey, *Pak J Bot* 36 (2004) 343-349.
- [28] N.J. Ekong, G.A. Akpan, I.J. Udo, Comparative effects of colchicine, 8-hydroxyquinoline and paradichlorobenzene on arm ratio of mitotic chromosomes of *Allium cepa* L., *Int J Med Plants and Altern Med* 2 (2014) 21-26.
- [29] A.M. Ortiz, M.C. Silvestri, G.I. Lavia, Karyotypic studies in wild species of *Arachis* (Leguminosae) belonging to sections Erectoides, Procumbentes and Rhizomatosae *Bol Soc Argent Bot* 48 (2013) 295-300.
- [30] L.P. Pereira, L.P. Luz, S.B. Tedesco, A.C.F. Silva, Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, *Cienc Rural* 36 (2006) 678-681.
- [31] J.M. Fachinetto, S.B. Tedesco, Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., *Rev Bras Plantas Med* 11 (2009) 110-116.
- [32] J.R. Daviña, M. Grabiele, J.C. Cerutti, D.H. Hojsgaard, R.D. Almada, I.S. Insaurrealde, A.I. Honf, Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina, *Genet and Mol Biol* 32 (2009) 811-821. DOI: 10.1590/S1415-47572009005000089
- [33] R. Biegelmeier, J.M.M Andrade, A.L. Aboy, M.A. Apel, R.R. Dresch, R. Marin, M.D.C.B. Raseira, A.T. Henriques, Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit, *J. of Food Sci* 76 (2011) 991-996. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x.
- [34] E.A. Decker, Phenolics: prooxidants or antioxidants?, *Nutr Rev* 55 (1997) 396-407.

- [35] M.L.P Bianchi, L.M.G. Antunes, Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 12 (1999) 123-130.
- [36] L.M.B. Torres, M.K. Akisue, N.F. Roque, Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil, *Rev Farm Bioquim* 23 (1987) 33-40.
- [37] N.F. Roque, W. Vilegas, T.L. Gianella, F.S. Knudsen, G. Rondella, L.M.B. Torres, V.O. FERRO, F. OLIVEIRA, Estudo químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microleptis* e *Wedelia paludosa*, *Supl Acta Amazon* 18 (1988) 473-476.
- [38] L.B. Pavanelo, Potencial antiproliferativo e determinação de compostos fenólicos de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- [39] F.S.F. Smolarek, P.M.P. Nunes, F.C. Cansian et al., Abordagem fitoquímica e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* D.C., *Visão Acad* 10 (2009) 77-82.
- [40] K.P. McCook-Russell, M.G. Nair, P.C. Facey, C.S. Bowen-Forbes, Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits, *Food Chem* 134 (2012) 1069–1073. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.018
- [41] V.C. Desoti, C.L. Maldaner, M.S. Carletto et al., Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná, *Arq Cienc Saúde da UNIPAR* 15 (2011) 3-13.
- [42] A. Luximon-Ramma, T. Bahorun, A. Crozier, Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits, *J Sci Food Agric* 83 (2003) 496–502. DOI: 10.1002/jsfa.1365
- [43] M. Schmidt, H. Bastians, Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updates* 10 (2007) 162–181.
- [44] I.T. Oyeyemi, A.A. Bakare, Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells, *Caryologia* 66 (2013) 360-367. DOI: 10.1080/00087114.2013.857829
- [45] A.L. Alvarenga, R.F. Schwan, D.R. Dias, K.R.F. Schwan-Estrada, C.E.C. Bravo-Martins, Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas, *Rev Bras Plantas Med* 9 (2007) 86-91.

## ARTIGO 2

### Determinação de compostos fenólicos e avaliação do potencial genotóxico e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae).<sup>2</sup>

HISTER, C.A.L.<sup>1</sup>; BOLIGON, A.A.<sup>2</sup>; ATHAYDE, M.L.<sup>2</sup>; TEDESCO, S.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900

<sup>2</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria

**RESUMO:** *Psidium cattleianum* Sabine, espécie nativa do Brasil, é valorizada pelo seu uso na medicina popular. O presente trabalho visou avaliar a atividade genotóxica e antiproliferativa do extrato aquoso das folhas de *P. cattleianum* pelo teste de *Allium cepa* L., bem como testar sua capacidade de reverter mutações ocasionadas pela exposição ao glifosato e ainda determinar os compostos fenólicos presentes nesse extrato. Folhas foram coletadas em quatro acessos: Cerro Largo, Segredo, Tupanciretã e Silveira Martins. Os extratos foram preparados por decocção das folhas em duas concentrações: 15 g.L<sup>-1</sup> e 75 g.L<sup>-1</sup>. Água destilada foi utilizada como controle negativo e glifosato 2% como controle positivo. Foram analisadas 8000 mil células por tratamento e os índices mitóticos (IM) calculados. Amostras dos extratos aquosos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. A análise estatística foi realizada pelos testes Qui-quadrado e Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que os extratos inibiram a divisão celular de raízes de *A. cepa*, pois o valor do índice mitótico diminuiu à medida que a concentração do extrato aumentou. Apenas o acesso de Cerro Largo na concentração 15 g.L<sup>-1</sup> apresentou genotoxicidade. Os extratos testados na recuperação reverteram parcialmente as alterações cromossômicas, porém um acesso diminuiu o IM e o outro aumentou, em relação ao controle positivo. A CLAE mostrou a predominância de quercitrina em um acesso e quercitina nos demais. Conclui-se que os extratos aquosos de araçá possuem atividade antiproliferativa sobre a divisão celular de *A. cepa*, o que pode ser extrapolado para outros tipos celulares eucarióticos.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*, araçá, cromatografia líquida, genotoxicidade, índice mitótico

---

<sup>2</sup> Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

**ABSTRACT: Determination of phenolic compounds and assessment of the genotoxic and antiproliferative potential of *Psidium cattleianum* Sabine leaf aqueous extracts.** *Psidium cattleianum* Sabine, also known as strawberry guava tree, is a Brazilian native species valued for its use in popular medicine. This study aims at evaluating the genotoxic and antiproliferative activity of *P. cattleianum* aqueous extracts using *Allium cepa* test, as well as test their ability to revert mutations resulting from glyphosate exposure and also determine the phenolic compounds present in this extract. Leaves of 4 accessions were collected in Cerro Largo, Segredo, Tupanciretã and Silveira Martins for aqueous extracts preparation at concentrations of 15 g.L<sup>-1</sup> and 75 g.L<sup>-1</sup>. Distilled water was used as negative control, whereas a 2% glyphosate solution served as positive control. 8000 cells were analyzed in each treatment and the mitotic index (MI) was calculated. The extract samples were analyzed by high-performance liquid chromatography – HPLC. Statistical analysis was conducted using Chi-square and Scott-Knott tests (p < 0,05). The results showed that the extracts inhibited the cell cycle of the onion roots, since the mitotic index decreased as the extract concentration increased. Genotoxicity was observed only in the accession collected in Cerro Largo at a concentration of 15 g.L<sup>-1</sup>. As for reversion, the extracts partially reverted chromosomal alterations. However, one accession caused the mitotic index to decrease, while the other caused it to increase in comparison to the positive control. The analysis conducted by HPLC showed a predominant presence of quercitrin in one accession and quercetin in the remaining ones. We concluded that the aqueous extracts of *Psidium cattleianum* cause antiproliferative activity on the cell cycle of *Allium cepa*, which may be valid to other types of eukaryotic cells.

**Keywords:** *Allium cepa*, strawberry guava, liquid chromatography, genotoxicity, mitotic index

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 3,5 bilhões de pessoas de países em desenvolvimento confiam e fazem uso no tratamento à base de plantas medicinais. Em todo o mundo, aproximadamente 85% das pessoas são praticantes de sistemas tradicionais de cura a base de plantas (Rai et al. 2000). Entre os fármacos empregados nos países industrializados, estima-se que 25% tenham sido desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (Yunes & Cechinel Filho, 2001).

Dentre as plantas que requerem atenção especial está *Psidium cattleianum* Sabine, pertencente à família Myrtaceae. É uma espécie de Mata Atlântica, com altura de três a seis metros, ocorrendo naturalmente desde a Bahia até o Rio

Grande do Sul. A folhagem do araçá é perene, as folhas são simples, opostas, glabras, aspecto coriáceo e de forma ovalada (LORENZI et al., 2006). Popularmente é conhecido por diversos nomes: araçá, araçá-vermelho, araçá-rosa, araçá-amarelo, araçá-de-coroa (Lorenzi, 1992).

O araçazeiro apresenta grande potencial para exploração econômica, pela boa aceitação de seus frutos para consumo e pelo alto teor de vitamina C, proporcionalmente quatro vezes maior que os frutos cítricos (Natchigal, 1994; Casagrande Júnior, 1996; Franzon, 2004; Ribeiro, 2007). Além do consumo de seus frutos *in natura*, é uma espécie utilizada com fins medicinais como antidiarreico e antidisentérico (Alice et al., 1995) e usado para tratar de doenças das vias urinárias (Boscolo & Valle, 2008).

No entanto, o consumo indiscriminado de chás ou derivados merece uma atenção especial, devido ao fato de desconhecimento a respeito de seus constituintes químicos, que podem causar, muitas vezes, mais danos à saúde que benefícios. Os componentes da biodiversidade necessitam maiores estudos em seus ecossistemas naturais, visto que uma pequena parte de seus princípios ativos foi adequadamente estudada e cujos benefícios permanecem desconhecidos (Guerra & Nodari, 2007).

Segundo Gan e Ye (2006) a análise dos extratos de plantas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido utilizada para verificar a autenticidade ou fornecer o controle de qualidade das plantas medicinais, pois fornece um perfil químico sob a forma de um cromatograma. A utilização de perfis cromatográficos ou *fingerprints* são importantes para a análise de extratos vegetais uma vez que possibilita obter a representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise (Alaerts et al., 2007).

De acordo com Varanda (2006) substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem sua interação com os ácidos nucleicos, e os ensaios para detectar tais substâncias permitem identificar riscos potenciais aos seres humanos. Agentes mutagênicos podem ser detectados citologicamente pela inibição celular; interrupção na metáfase; indução de aberrações cromossômicas, numérica e estrutural, que vão desde a fragmentação cromossômica à desorganização do fuso mitótico, e, conseqüentemente, comprometendo todas as fases seguintes da mitose (Tedesco & Laughinghouse IV, 2012).

O nível de citotoxicidade de uma substância pode ser determinado pelo aumento ou pelo decréscimo do índice mitótico (IM), caracterizado pelo número de células em divisão no ciclo celular em um organismo-teste (Leme et al., 2008), como também pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou a formação de micronúcleos (Souza S.A.M. et al., 2005).

O teste de *Allium cepa* L. é um método que utiliza a cebola como bioindicador de possíveis efeitos adversos sobre os cromossomos de produtos químicos, extratos de plantas, misturas complexas entre outros, uma vez que nesse bioteste as raízes de cebola permanecem por um período diretamente em contato com a substância em estudo. Este método é validado como um eficiente bioteste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (United Nations Environment Programme – UNEP) (Cabrera & Rodriguez, 1999; Bagantini et al., 2007; Fachinetti et al., 2007; Frescura et al., 2013a). Em experimento de mutagenicidade de infusões de *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L., que foi realizado por Teixeira et al. (2003), utilizando células meristemáticas de raízes de cebola, células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos como bioindicadores, os autores observaram os mesmos resultados para os três tipos de células eucarióticas testadas, reforçando a confiabilidade do teste de *A. cepa* em estudos citogenéticos.

Este trabalho objetivou determinar os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de *P. cattleianum*, bem como analisar a existência de atividade genotóxica e antiproliferativa do extrato por meio da observação de possíveis danos cromossômicos e também da inibição da divisão meristemática em células de pontas de raízes de *A. cepa*, servindo como bioindicador de possíveis danos a outros tipos celulares, principalmente células humanas.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de material botânico**

As folhas de araçá [*Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae)], de quatro acessos de diferentes municípios do Rio Grande do Sul (Cerro Largo = CL, Segredo = SE, Silveira Martins = SiM e Tupanciretã = TU) foram coletadas nos meses de julho e agosto de 2013, antes do período de florescimento. O material coletado foi devidamente identificado e incorporado ao herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) do Departamento de Biologia da UFSM, sob os números 15.087, 15.067, 15.066 e 15.068, respectivamente.

### **Preparo dos extratos aquosos**

Após a coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas em sacos de papel até o uso. Os extratos das folhas foram preparados por decocção, na concentração de 15 gramas de folhas secas em 1 litro de água destilada durante 5 minutos, e também na concentração de 75 g.L<sup>-1</sup>.

Após o preparo, os extratos foram coados e colocados em copos plásticos de 50 ml onde os bulbos de cebola previamente enraizados em água destilada permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente.

### **Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)**

Uma amostra de cada extrato, na concentração de 75 g.L<sup>-1</sup>, foi separada para a realização de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

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

Todos os reagentes químicos foram de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Rutina, epicatequina, catequina, isoquercetina,

quercetina, quercitrina e canferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) e auto injetor Shimadzu (SIL-20A), equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) ligadas a um desgaseificador (20A5 DGU) com um integrador (CBM 20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e software (LC solution SP1 1.22).

#### *Quantificação de compostos por CLAE*

As análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa sob condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro 5  $\mu\text{m}$ , a fase móvel utilizada foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi: 5% (B) durante 2 min, 25% (B) até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 min, seguindo o método descrito por Peroza et al. (2013) com pequenas modificações.

Os extratos aquosos foram analisados a uma concentração de 75  $\text{g.L}^{-1}$ . O fluxo usado foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção de 40  $\mu\text{L}$  e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para o ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogênico, e 365 nm para rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e canferol. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultrassom antes da utilização.

As soluções de referência foram preparadas na fase móvel para CLAE nas concentrações de 0,050-250 mg/mL para rutina quercetina, quercitrina, isoquercitrina, canferol, catequina e epicatequina; e 0,030-450 mg/mL para ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os dos padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500 nm). A curva de calibração para o ácido gálico foi:  $Y = 12739x + 1186,9$  ( $r = 0,9994$ ); ácido clorogênico:  $Y = 11976x + 1206,5$  ( $r = 0,9997$ ), ácido cafeico:  $Y = 12573x + 1270,3$  ( $r = 0,9996$ ), ácido elágico:  $Y = 13062x + 1269,3$  ( $r = 0,9990$ ), catequina:  $Y = 11968x + 1347,1$  ( $r = 0,9995$ ), epicatequina:  $Y = 12763x + 1269,5$  ( $r = 0,9993$ ), quercetina:  $Y = 13184x + 1256,1$  ( $r = 0,9999$ ), isoquercetina:  $Y = 11985x + 1359,7$  ( $r = 0,9996$ ), quercitrina:  $Y = 13065x + 1249,6$  ( $r = 0,9993$ ), rutina:  $Y = 13583x + 1267,5$  ( $r = 0,9998$ ) e canferol:  $Y = 13423x + 1153,2$  ( $r = 0,9998$ ).

Todas as operações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas, e a inclinação, usando três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como  $3.3$  e  $10 \sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta, e  $S$  é a inclinação da curva de calibração.

### **Tratamentos e critérios de análise**

As células meristemáticas da raiz de *A. cepa* foram utilizadas como sistema teste para avaliar as alterações cromossômicas morfológicas e estruturais e determinar os índices mitóticos. A avaliação da genotoxicidade de *P. cattleianum* se baseou em tratamentos com extratos aquosos de folhas de quatro acessos (Cerro Largo = CL, Segredo = SE, Silveira Martins = SiM e Tupanciretã = TU) em duas concentrações diferentes, a usual de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  (Anvisa, 2010) e  $75 \text{ g.L}^{-1}$  (cinco vezes mais concentrado), com quatro bulbos (repetições) de *A. cepa* por tratamento. O experimento também buscou avaliar se os extratos aquosos teriam a capacidade de reverter alterações cromossômicas causadas pelo glifosato, o que foi chamado de pós-tratamento. Água destilada foi utilizada como controle negativo e glifosato foi utilizado como controle positivo, pois comprovadamente induz alterações cromossômicas e inibe a divisão celular em células meristemáticas de *A. cepa* (Souza, L.F. et al., 2010).

As escamas secas sobre as cebolas foram removidas com cuidado, sem danificar o anel de raízes. A seguir, 13 grupos de quatro bulbos, cada um correspondendo a um tratamento, foram colocados para enraizar em água destilada. Após o enraizamento, um grupo permaneceu em água destilada, sendo o controle negativo, outros quatro grupos foram colocados em solução de glifosato a 2% (controle positivo), e os demais foram transferidos para os diferentes extratos aquosos, onde os bulbos de cebola previamente enraizados em água destilada permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente.

Dos quatro grupos de bulbos tratados com glifosato, um serviu para controle positivo e os demais passaram por um pós-tratamento, ou seja, após foram transferidos e permaneceram por mais 24 horas, em água e em extratos aquosos de dois acessos diferentes, escolhidos por serem acessos de dois municípios de maior

altitude e teoricamente possuir maior quantidade de compostos fenólicos nas folhas, para avaliar se haveria uma recuperação do efeito mutagênico do glifosato.

Após o período de aplicação dos tratamentos, as radículas dos bulbos de cebola (incluindo os controles) com aproximadamente 5 mm foram coletadas, fixadas em etanol:ácido acético (3:1), por 24 horas, e após foram armazenadas em etanol 70% sob refrigeração para posterior análise do ciclo celular. Para a confecção das lâminas, as pontas das raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N por 5 minutos e após foram lavadas em água destilada. Com auxílio de um microscópio estereoscópio, a coifa das raízes foi retirada, a região meristemática corada comorceína acética 2% e esmagada com auxílio de um bastão de vidro e sobre o material colocada uma lamínula.

A análise das lâminas ao microscópio óptico foi realizada, sendo que para cada bulbo foram feitas duas repetições, confeccionando-se duas lâminas. Mil células por lâmina foram analisadas, totalizando 2000 células por bulbo, e 8000 células por tratamento. Os valores dos índices mitóticos (IM) foram calculados com base na porcentagem de células em divisão (razão do número de células em divisão pelo número total de células analisadas, multiplicado por 100). Além das fases da divisão celular, possíveis irregularidades, como: quebras cromossômicas, pontes, cromossomos perdidos ou atrasados e presença de micronúcleos.

### **Análise estatística**

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Os valores dos índices mitóticos foram comparados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa BIOESTAT 5.0 (Ayres et al., 2007). Já as médias dos compostos fenólicos resultantes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram comparadas utilizando-se o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), com o auxílio de programa Assistat®, versão beta 7.7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da análise do ciclo celular das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* podem ser observados na Tabela 1, onde são apresentados o número total de células analisadas, em interfase e nas demais fases da divisão celular, bem como os valores dos índices mitóticos.

TABELA 1 – Número de células de *Allium cepa* analisadas em interfase, em divisão, presença de irregularidades e ainda índices mitóticos (IM) dos diversos controles e tratamentos com extratos aquosos por decoção das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine em diferentes concentrações e para populações distintas, bem como tratamentos de recuperação.

Tratamentos	Células em interfase	Células em divisão	Células com irregularidades	Índice mitótico - IM (%)
T1 - controle negativo (água destilada)	7470	530	3	6,62 a*
T2 – extrato aquoso 15 g.L <sup>-1</sup> (CL)	7724	276	17	3,45 c
T3 - extrato aquoso 75 g.L <sup>-1</sup> (CL)	7937	63	2	0,79 g
T4 - extrato aquoso 15 g.L <sup>-1</sup> (SE)	7774	226	5	2,82 d
T5 - extrato aquoso 75 g.L <sup>-1</sup> (SE)	7929	71	-	0,89 g
T6 - extrato aquoso 15 g.L <sup>-1</sup> (TU)	7729	271	6	3,39 c
T7 - extrato aquoso 75 g.L <sup>-1</sup> (TU)	7935	65	-	0,81 g
T8 - extrato aquoso 15 g.L <sup>-1</sup> (SiM)	7856	144	1	1,8 f
T9 - extrato aquoso 75 g.L <sup>-1</sup> (SiM)	7860	140	-	1,75 f
T10 - controle positivo (glifosato 2%)	7743	257	59	3,21 c
T11 - pós-tratamento em água destilada	7724	276	26	3,45 c
T12 - pós-tratamento em extrato aquoso a 15 g.L <sup>-1</sup> – TU	7807	193	9	2,41 e
T13 - pós-tratamento em extrato aquoso a 15 g.L <sup>-1</sup> – SiM	7676	324	17	4,05 b

CL = Cerro Largo; SE = Segredo; TU = Tupanciretã; SiM = Silveira Martins. \*IM seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste do Qui-Quadrado, a um nível de 5% de probabilidade de erro.

Através dos dados apresentados na Tabela 1 é possível verificar que os extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum* possuem efeito antiproliferativo sobre

as pontas de raízes de *A. cepa*, em relação ao controle negativo. E quanto maior a concentração do extrato, menor o índice mitótico (IM) encontrado. Observa-se também que apesar de todos os extratos na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> diminuírem a proliferação celular, esta variou entre os acessos, sendo que os de CL e TU não diferiram significativamente, mas diferiram dos acessos SE e SiM, indicando que há variabilidade genética entre eles e também diferenças nas condições edafoclimáticas dos diferentes acessos, as quais também têm papel importante no metabolismo vegetal. A diminuição da divisão celular foi ainda maior nos tratamentos com os extratos aquosos em concentração cinco vezes maior que a indicada (75 g.L<sup>-1</sup>), sendo que o T9 (acesso SiM) foi o que teve o menor IM, 1,75% diferindo significativamente do IM dos demais tratamentos com extrato aquoso nesta mesma concentração (T3 = 0,79%, T5 = 0,89% e T7 = 0,81%). Testes realizados com infusão de folhas de *Psidium guajava* L. (goiaba), na concentração mais elevada de 26,2 g.L<sup>-1</sup>, mostraram uma forte inibição da divisão nas células de ponta de raiz de *A. cepa* e este efeito não era irreversível, com a divisão celular recuperada depois de 24 horas na água (Teixeira et al., 2003).

O tratamento com o extrato do acesso coletado em Silveira Martins (SiM) chama a atenção pois este reduziu substancialmente o índice mitótico, de 6,62% na água destilada para 1,8% já na concentração mais baixa (15 g.L<sup>-1</sup>) e para 1,75% na concentração 75 g.L<sup>-1</sup>, não havendo diferença significativamente do IM entre as duas concentrações. A acentuada queda do IM, observada na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> deste acesso foi tamanha, que diferiu dos IM encontrados para os demais acessos estudados. Embora o acesso SiM apresentasse intensa atividade antiproliferativa, este não demonstrou ser genotóxico.

Apesar de todos os tratamentos com extratos aquosos diminuírem a divisão celular, as alterações cromossômicas observadas foram irrelevantes, considerando os acessos coletados em Segredo (SE), Tupanciretã (TU) e Silveira Martins (SiM), na concentração mais baixa, não genotóxicos (Figura 1a e 1b). Com exceção do acesso do município de Cerro Largo (CL), na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, que apresentou o número de 17 alterações cromossômicas, como mostrado na figura 1c e 1d. Um pequeno número de alterações cromossômicas também foram encontradas nos tratamentos com extrato na concentração de 75 g.L<sup>-1</sup>, sugerindo que essa pouca incidência de alterações seja devida ao fato de que nessa

concentração mais elevada a divisão celular declinou de uma maneira tão acentuada que não foi possível observar a ocorrência de mais danos cromossômicos.

Observações similares foram realizadas por Lubini et al., (2008), mostrando efeitos antiproliferativos de *Psychotria myriantha* Mull. Arg. e *P. leiocarpa* Cham. et Schlecht sobre a divisão celular de pontas de raízes de cebola, sendo que a primeira também apresentou atividade genotóxica. Na mesma linha, ação antiproliferativa também foi relatada por Fachinetto et al. (2007), em seu trabalho com infusões de marcela (*Achyrocline satureioides* DC.) sobre raízes de *A. cepa*, atribuindo esta observação à atividade dos diferentes compostos químicos presentes na infusão. Comparato et al. (2002), em análises de células meristemáticas de bulbos de cebola, verificaram que concentrações mais elevadas de extrato de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e de pata-de-vaca (*Bauhinia candicans* Benth) promoveram a redução no índice mitótico, mas não o surgimento de alterações cromossômicas. Pastori et al. (2013) demonstraram a presença de atividade genotóxica e antiproliferativa em infusões de folhas de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) usando o sistema-teste vegetal em cebola.

A atividade antimitótica sobre o meristema apical de raízes de cebola apresentada pelos extratos aquosos das cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC provavelmente é parte do modo de ação destes no tratamento de câncer, que além da inibição eficaz da divisão celular – uma exigência para potenciais drogas anticâncer extraídas de plantas medicinais – necessita apresentar uma toxicidade mínima para células saudáveis do organismo tratado (Sheng et al., 2000; Kurás et al., 2006).

Os tratamentos de recuperação dos bulbos de cebola, realizados com água destilada e extratos aquosos de dois acessos de arará, após o período de 24 horas de exposição ao glifosato (Figura 1e e 1f) mostraram que não houve diferença significativa nos valores dos IM do pós-tratamento em água e do controle positivo, ou seja, a água não reverteu a ação antiproliferativa do glifosato. Porém, o número de irregularidades encontradas no pós-tratamento com água reduziu quase pela metade. O efeito antiproliferativo do glifosato só foi parcialmente revertido após o T13 (tratamento com chá a  $15 \text{ g.L}^{-1}$  - acesso SiM), como também foi relatado em estudo utilizando extrato aquoso das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Briton e *P. birotula* Smith & Downs como tratamento de recuperação após o glifosato (Frescura et al., 2013b).

Além da reversão parcial da divisão celular ocasionada pelo pós-tratamento T13, também ocorreu a diminuição significativa da ocorrência de irregularidades em relação ao pós-tratamento com água destilada, sendo o acesso SiM (15 g.L<sup>-1</sup>) este acesso considerado antimutagênico. Ademais, este mesmo acesso foi o que mais diminuiu a divisão celular, sendo também antiproliferativo, nas duas concentrações testadas. Da mesma forma que Sturbelle et al. (2010) revelaram que uma solução de *Aloe vera* L. apresentava ação antimutagênica quando utilizada como pós-tratamento após o paracetamol, pelo teste de *Allium cepa*.

Apesar da ocorrência de inibição da divisão observada nos tratamentos com os extratos aquosos de *P. cattleianum*, as alterações cromossômicas encontradas nos tratamentos não são suficientes para considerá-los genotóxicos, excetuando-se apenas o T2, que teve irregularidades significativas em relação ao controle em água destilada (Figura 1f). Comparativamente, Costa et al. (2008) observou que a mistura de compostos presentes nos extratos das folhas de *P. cattleianum* não apresentaram efeitos genotóxicos/mutagênicos em alguns tipos de células *in vivo* de *Mus musculus*.

A Figura 1, a seguir, evidencia algumas das alterações observadas nas células de raízes de cebola durante o ciclo celular nos diversos tratamentos.



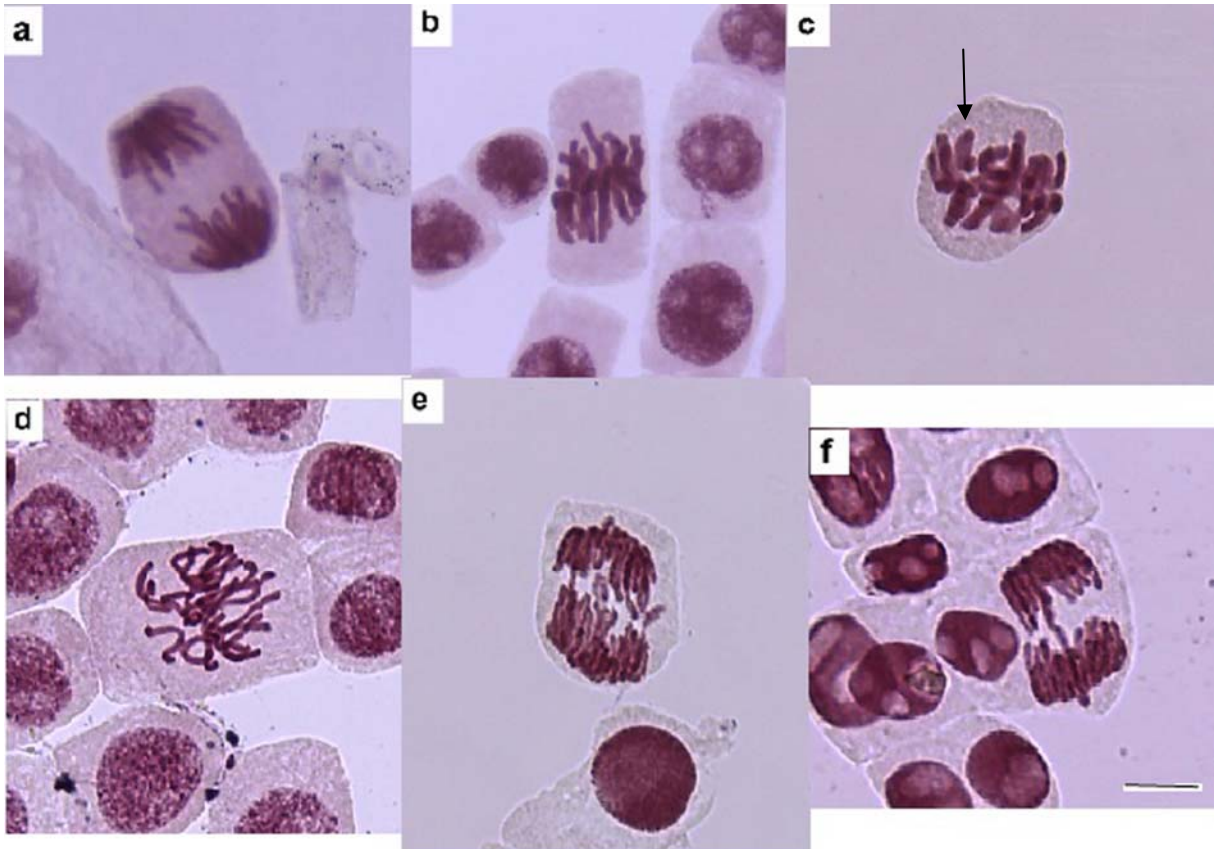
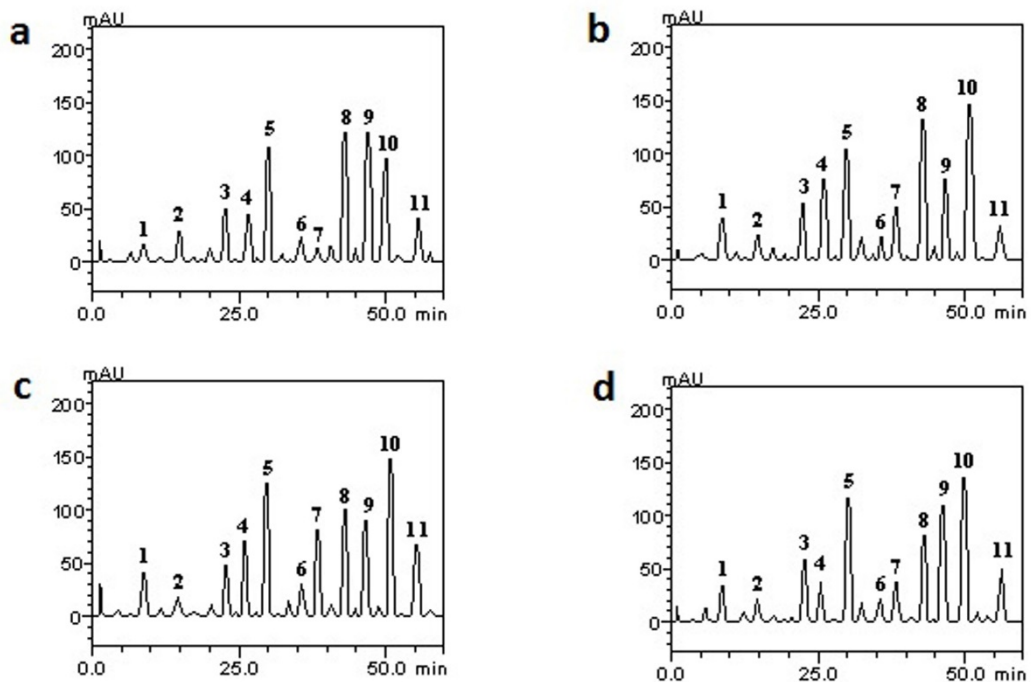


FIGURA 1 – Células meristemáticas de raízes de cebola em divisão celular: a) tratamento T1 (controle negativo) – anáfase normal; b) T4 (extrato aquoso  $15\text{g.L}^{-1}$ , acesso Segredo) – metáfase normal; c) T2 (extrato aquoso  $15\text{g.L}^{-1}$ , acesso Cerro Largo) – metáfase com quebra cromossômica (seta); d) T6 (extrato aquoso  $15\text{g.L}^{-1}$ , acesso Tupanciretã) – metáfase irregular; e) T10 (controle positivo) – anáfase com ponte e quebra; f) ponte na anáfase em T10. Escala:  $10\mu\text{m}$ .

Estudos realizados por Souza, G.C. et al. (2004), comprovaram a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das folhas do araçazeiro, por meio do método de difusão em ágar, verificando atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

Menezes et al. (2010) verificaram a redução da população de *Streptococcus mutans* presentes em biofilmes dentais de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) depois destes serem tratados com extratos aquosos produzidos a partir de folhas secas e moídas de *P. cattleianum* e *Myracrodruon urundeuva* Allemão, em relação ao controle negativo. Resultados semelhantes foram obtidos por Brighenti et al. (2012) cujo experimento reuniu 10 voluntários e encontrou significativamente menos bactérias viáveis em biofilmes dentais após o tratamento com o extrato aquoso das folhas de *P. cattleianum*, obtido por decocção, comparado com o tratamento com água.

A análise de CLAE revelou nos cromatogramas a presença de diferentes compostos fenólicos nos extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum*: ácido gálico (tR = 8,71 min; pico 1), catequina (tR = 16,93 min; pico 2), ácido clorogênico (tR = 16,93 min; pico 3), ácido cafeico (tR = 23,46; pico 4), ácido elágico (tR = 16,93 min; pico 5), epicatequina (tR = 16,93 min; pico 6), rutina (tR = 37,51 min; pico 7), quercitrina (tR = 16,93 min; pico 8), isoquercitrina (tR = 48,95 min; pico 9), quercetina (tR = 48,95 min; pico 10) e canferol (tR = 48,95 min; pico 11). As Figuras 2a, 2b, 2c e 2d mostram o perfil cromatográfico dos extratos aquosos de *P. cattleianum* nos quatro acessos analisados.



**FIGURA 2** – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos aquosos de folhas de *Psidium cattleianum* Sabine: a) acesso 1 – Cerro Largo (CL); b) acesso 2 – Segredo (SE); c) acesso 3 – Tupanciretã (TU); d) acesso 4 – Silveira Martins (SiM); detecção UV a 327 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), isoquercitrina (pico 9), quercetina (10) e canferol (pico 11).

A Tabela 2 confirma os dados verificados no perfil e mostra a quantidade média de cada um dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum*, assim como a quantidade total de compostos em cada um dos quatro acessos coletados, obtidos por cromatografia (CLAE).

TABELA 2 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine de quatro acessos distintos, obtidos por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE).

Compostos	Extrato das folhas 75 g.L <sup>-1</sup> (CL)	Extrato das folhas 75 g.L <sup>-1</sup> (SE)	Extrato das folhas 75 g.L <sup>-1</sup> (TU)	Extrato das folhas 75 g.L <sup>-1</sup> (SiM)	LOD	LOQ
	mg.g <sup>-1</sup>				µg/mL	
Ácido gálico	0.18333 f*	0.44333 f	0.50333 f	0.36000 f	0.012	0.030
Catequina	0.32333 e	0.22333 g	0.18333 h	0.20333 g	0.019	0.062
Ácido clorogênico	0.62000 c	0.64000 e	0.54000 f	0.71333 e	0.031	0.101
Ácido cafeico	0.58333 c	0.76667 d	0.71667 e	0.34000 f	0.025	0.083
Ácido elágico	1.13667 b	1.05333 b	1.06333 b	1.33000 b	0.008	0.027
Epicatequina	0.22333 f	0.18000 g	0.42667 g	0.24000 g	0.027	0.089
Rutina	0.12667 g	0.52333 f	0.81667 c	0.35667 f	0.023	0.075
Quercitrina	1.25667 a	1.17000 a	0.86333 c	0.98667 d	0.014	0.045
Isoquercitrina	1.23667 a	0.87667 c	0.84333 c	1.17333 c	0.009	0.029
Quercetina	1.12000 b	1.24333 a	1.27333 a	1.44000 a	0.016	0.053
Canferol	0.48333 d	0.51000 f	0.76000 d	0.70667 e	0.022	0.073
TOTAL	7.293	7.629	7.989	7.85		

CL = Cerro Largo; SE = Segredo; TU = Tupanciretã; SiM = Silveira Martins. Resultados são expressos como média de três determinações. LOD é o limite de detecção e LOQ é o limite de quantificação. \*Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo Teste de Scoot-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os resultados das análises dos extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum* através de CLAE mostraram a predominância de quercetina (pico 10) nos acessos SE, TU e SiM. No acesso SE a quercetina é seguida pela quercitrina (pico 8), não diferindo significativamente uma da outra, e ácido elágico (pico 5), no acesso TU o segundo componente é o ácido elágico e o terceiro a quercitrina, e finalmente no acesso SiM o ácido elágico e a isoquercitrina (pico 9) são os mais abundantes após a quercetina. O acesso que apresenta uma pequena diferença em relação aos demais é o CL, apresentando a quercitrina (pico 8) em maior quantidade, seguida pela isoquercitrina (sem diferença significativa) e ácido elágico.

Compostos fenólicos, tais como flavonoides (quercitrina, isoquercitrina) tem como propriedade benéfica o sequestro de radicais livres (Decker, 1997). Outro flavonoide natural, a epicatequina, possui propriedade antioxidante e inibidora do processo de carcinogênese (Bianchi & Antunes, 1999). A presença do flavonoide quercitrina foi relatada em *Solidago microglossa* DC. (Torres et al., 1987; Roque et

al., 1988; Pavanelo, 2014), o qual confere à espécie, de acordo com Smolarek et al. (2009), atividades anti-inflamatória e analgésica.

A abundância de compostos fenólicos foi positivamente correlacionada com ação antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* (Medina et al., 2011), assim como atividade antioxidante e antiproliferativa. De acordo com Tomás-Barberán & Espín (2001), esse grupo de metabólitos secundários está relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares e câncer. Em estudos que tratam do efeito dos compostos fenólicos presentes na dieta, o ácido cafeico e derivados, os flavonóis como a quercetina, catequinas, resveratrol, entre outros, são as substâncias mais requeridas.

O óleo essencial de araçá foi caracterizado quimicamente por Paroul et al. (2009) e foram identificados sesquiterpenos como componentes majoritários e, além disso, uma importante atividade antimicrobiana foi relatada com o método de difusão em Agar frente à *Proteus vulgaris*. Relatos sobre atividade microbiana de extratos das folhas de *Psidium guajava* L. foram atribuídos à presença de taninos, triterpenoides e flavonoides nas folhas (Arima & Danno, 2002; Q'adan et al., 2005).

Além da variabilidade genética entre os acessos, há também influência do clima e principalmente da altitude de cada local onde os genótipos foram coletados, sobre a composição dos extratos aquosos. O município de Tupanciretã está situado a 465 metros acima do nível do mar, Silveira Martins tem 421 metros de altitude, Segredo 330 m e Cerro Largo 197 m. Os acessos que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos foram os coletados nos municípios de Tupanciretã e Silveira Martins. Altitudes mais altas possuem a característica de apresentarem temperaturas menores, principalmente durante o inverno, que é bem rigoroso no estado do Rio Grande do Sul. A variação de altitude e temperatura ocasiona diferenças na concentração dos compostos presentes em cada um dos genótipos. Koeppe et al. (1970) *apud* Gobbo-Neto & Lopes (2007) demonstraram que em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) houve um aumento de 4 a 5 vezes no conteúdo de escopolamina, ácido clorogênico e seus isômeros (compostos antioxidantes) após submissão a baixas temperaturas.

Os metabólitos secundários, como os compostos fenólicos absorvem e/ou dissipam a energia solar, dificultando a danificação dos tecidos pela radiação ultravioleta (UV) (Grace & Logan, 2000). Assim, Gobbo-Neto & Lopes (2007) confirmaram uma correlação positiva entre a intensidade da radiação solar e a

produção de compostos fenólicos, tais como flavonoides, taninos e antocianinas. Os mesmos autores correlacionaram uma maior susceptibilidade a raios UV em altitudes maiores, e como comentado anteriormente os flavonoides proporcionam proteção à radiação, sendo possível inferir que estes compostos estão presentes em maior quantidade em plantas de altas altitudes.

Desta forma, conclui-se que os extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum* possuem efeito antiproliferativo em *A. cepa*, sendo inversamente proporcional à concentração do extrato aquoso, ou seja, o valor do IM diminuiu à medida que a concentração do chá aumentou. Os acessos dos municípios de Segredo (SE), Tupanciretã (TU) e Silveira Martins (SiM) não são considerados genotóxicos, ao passo que o acesso de Cerro Largo (CL) na menor concentração (15 g.L<sup>-1</sup>) é genotóxico. A cromatografia líquida de alta eficiência revelou que a quercetina foi o composto fenólico mais abundante em três acessos (SE, TU e SiM) e quercitrina foi predominante no acesso CL. Os compostos secundários de plantas medicinais variam consideravelmente de acordo com vários fatores, provavelmente influenciando o seu valor terapêutico.

## REFERÊNCIAS

ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extract: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p.1-8, 2007.

ALICE, C.B. et al. **Plantas medicinais de uso popular**: Atlas farmacognóstico. Canoas: Ulbra, 1995, 205 p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 45, de 28 de dezembro de 2010.

ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1727–1730, 2002.

AYRES, M. et al. 2007. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: ONG Mamiraua, 2007, 364p.

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

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOSCOLO, O.H.; VALLE L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

BRIGHENTI, F.L. et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition *in situ*. **Archives of oral biology**, v. 57, n. 1036, p. 1034-1040, 2012.

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

CAMPARATTO, M.L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. and *Bauhinia candicans* Benth. infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.

CASAGRANDE JÚNIOR, J.G. et al. Efeito de materiais orgânicos no crescimento de mudas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 2, n. 3, p. 187-191, 1996.

COSTA, T.D.A. et al. Absence of mutagenicity effects of *Psidium cattleyanum* Sabine (Myrtaceae) extract on peripheral blood and bone marrow cells of mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 679-686, 2008.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

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, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x/pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

FRANZON, R.C. **Caracterização de mirtáceas nativas do sul do Brasil**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

FRESCURA, V.D. et al. Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (Rubiaceae) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (Brassicaceae). **Caryologia**, v. 66, n. 2, p. 138-144, 2013a.

FRESCURA, V.D. et al. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. **Biocell**, v. 37, n. 2, p. 23-28, 2013b.

GAN, F.; YE, R. New approach on similarity of chromatography fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 100-105, 2006.

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.

GRACE, S.C.; LOGAN, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical Transactions B**, v. 355, p. 1499-1510, 2000.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.), **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 13-28.

KURAS, M. et al. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 211-221, 2006.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, XXIV, p. 471-486, 1938. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.

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

MEDINA, A.L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.

MENEZES, T.E.C. et al. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 3, p. 300–305, 2010.

MORI, S.A. et al. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. 2. ed. Ilhéus: CEPLAC, 1989, 104p.

NACHTIGAL, J.C. **Propagação de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) através de estacas semilenhosas**. 1994. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

PAROUL, N. et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Psidium cattleyanum* (Araçá-do-campo). In: 25<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, 2009, **Anais eletrônicos**. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0507-1.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2014.

PASTORI, T. et al. Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 10, p. 1249-1255, 2013.

PAVANELO, L.B. **Potencial antiproliferativo e determinação de compostos fenólicos de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud.** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.



PEROZA, L.R. et al. *Bauhinia forficata* prevents vacuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 4, p. 789–796, 2013.

Q'ADAN, F. et al. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to Acne developing organisms. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 33, n. 2, p. 197-204, 2005.

RAI, L.K.; PRASAD, P.; SHARMA, E. Conservation threats to some important medicinal plants of the Sikkim Himalaya. **Biological Conservation**, v. 93, p. 27-33, 2000.

RIBEIRO, M.S. **Multiplicação e enraizamento *in vitro* de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) cultivar Irapuã**. 2007. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

ROQUE, N.F. et al. Estudo químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microleptis* e *Wedelia paludosa*. **Suplemento Acta Amazônica**, v. 18, n. 1-2, p. 473-476, 1988.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 115-126, 2000.

SMAKA-KINCL, V. et al. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, v. 368, p. 171–179, 1996.  
Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165121896900592>>. Acesso em: 29 out. 2014.

SMOLAREK, F.S.F. et al. Abordagem fitoquímica e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* D.C. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 1, p. 77-82, 2009.

SOUZA, G.C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, L.F. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v. 67, p. 871-877, 2010.

SOUZA, S.A.M. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005.

STURBELLE, R.T. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 409-415, 2010.

TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, 2012. Dr. Jatin Srivastava (Ed.). Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test>>. Acesso em: 02 out. 2014.

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

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 9, p. 853-876, 2001.

TORRES, L.M.B.; AKISUE, M.K.; ROQUE, N.F. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 23, n. 1, p. 33-40, 1987.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Org.), **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Brasil: Argos, 2001, p. 18-44.

## ARTIGO 3

### **Avaliação colorimétrica dos grãos de pólen de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae).<sup>3</sup>**

HISTER C.A.L.<sup>1</sup>; TEDESCO S.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900.

**RESUMO:** A análise dos grãos de pólen através de sua forma, tamanho e também pela capacidade de coloração permite a determinação de sua viabilidade polínica. O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência dos corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander, para estimar a viabilidade polínica de *Psidium cattleianum* – uma árvore de frutos muito apreciados que também é utilizada para fins medicinais. Botões florais de 20 acessos foram coletados e fixados em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas, após os botões foram transferidos para etanol 70% e mantidos sob refrigeração. A técnica de esmagamento das anteras foi utilizada no preparo das lâminas. Em cada acesso foram confeccionadas 2 lâminas por corante e analisados 500 grãos de pólen em cada lâmina. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos de pólen viáveis. A análise estatística foi realizada pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os grãos de pólen corados com orceína acética 2% apresentaram viabilidade superior a 97,9%. Nenhum dos acessos diferiu significativamente para este corante. A viabilidade polínica através da coloração com o reativo de Alexander variou de 43% a 97%, mostrando que há variabilidade genética entre os acessos. Em apenas dois acessos não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade encontrados através dos dois corantes testados. Conclui-se que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica de *P. cattleianum* e que o reativo de Alexander é o mais preciso, devido a sua dupla coloração (verde de malaquita e fucsina ácida).

**Palavras-chave:** Araçá, orceína acética, reativo de Alexander, viabilidade polínica

**ABSTRACT:** **Colorimetric assessment of *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) pollen grains.** The analysis of pollen grains by their shape, size and also the coloring ability makes it possible to determine their pollen viability. The purpose of this study was to compare the efficiency of two stains, namely 2% acetic orcein and Alexander's stain, in estimating the pollen viability of *Psidium cattleianum*

---

<sup>3</sup> Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Plantas Medicinais.

– a valued fruit tree, also known as strawberry guava tree, which is used for medicinal purposes. Flower buds of 20 different accessions were collected and fixed in ethanol/acetic acid (3:1 v/v) for 24 hours at room temperature. Subsequently, they were stored in 70% ethanol under refrigeration. The anther squash technique was performed for slide preparation. In each accession two slides per stain and 500 pollen grains were analyzed. The pollen viability was estimated according to the percentage of viable pollen grains. Statistical analysis was conducted using Scott-Knott test ( $p < 0,05$ ). Pollen grains stained with 2% acetic orcein evinced a viability level higher than 97,9%. Besides, none of the accessions stained with this dye differed significantly. The pollen viability estimated with Alexander's stain varied from 43% to 97%, indicating the genetic variability among the accessions. There was no significant difference among the levels of viability found by means of the two stains in only two accessions. In conclusion, 2% acetic orcein overestimated the pollen viability of *P. cattleianum*, whereas the Alexander's stain is in turn more accurate due to its two stains (green malachite and fuchsine).

**Keywords:** strawberry guava, acetic orcein, Alexander's stain, pollen viability

## INTRODUÇÃO

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas no Brasil, possui grande riqueza de espécies e semelhança entre as mesmas, porém ocorrem em distintos ambientes e também apresentam problemas taxonômicos. Várias espécies da família são utilizadas na alimentação e também possuem propriedades medicinais (Costa, 2004).

No geral, a família Myrtaceae apresenta pequena variação no número cromossômico, observando-se  $n = 11$  na maioria dos gêneros (Rye, 1979). Aproximadamente 75% das espécies do gênero *Psidium* são poliploides, apresentando variação no nível de poliploidia com número somático variando de  $2n = 33, 44, 55, 66, 77$  e  $88$  (Atchinson, 1947; Costa & Forni-Martins, 2006a). Além do potencial para utilização dos frutos *in natura* ou como matéria prima para a agroindústria, algumas espécies nativas de *Psidium* também vêm chamando a atenção da indústria farmacêutica por produzirem frutos ricos em vitaminas e também em substâncias antioxidantes, além de óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta (Frazon et al., 2009). Tais características são de grande importância comercial, sobretudo para a agricultura familiar, sendo fonte de renda alternativa e sustentável.

Dentre as espécies deste gênero, destaca-se *Psidium cattleianum*, conhecida popularmente como araçazeiro, é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul que apresenta grande potencial para exploração econômica, pela boa aceitação de seus frutos para consumo e pelo alto teor de vitamina C, proporcionalmente quatro vezes maior que os frutos cítricos (Natchigal, 1994; Casagrande Júnior, 1996; Franzon, 2004; Ribeiro, 2007). Além do consumo de seus frutos *in natura*, é uma espécie utilizada com fins medicinais como antidiarreico e antidisentérico (Alice et al., 1995) e usado para tratar de doenças das vias urinárias (Boscolo & Valle, 2008).

O cultivo de plantas medicinais tanto em pequena ou grande escala requer estudos que levem ao conhecimento da espécie, desde a sua correta identificação taxonômica até estudos de caracterização do germoplasma das espécies, principalmente estudos citogenéticos, os quais auxiliam na resolução de problemas taxonômicos, minimizando as dificuldades na identificação e no estabelecimento das relações naturais entre as espécies; fornecem dados importantes para a compreensão da evolução das espécies e são necessários para a realização de um programa de melhoramento genético, através da obtenção de informações sobre a variabilidade genética, problemas de esterilidade e possibilidades de cruzamentos (Tedesco, 2000).

A grande variação existente em *P. cattleianum*, inclusive aquela relacionada à cor de seus frutos, levam à necessidade de buscar um melhor conhecimento do organismo em estudo, sob vários aspectos, sejam eles ecológicos, genéticos, morfológicos, químicos, entre outros (Sousa & Sobral, 2007). A possibilidade de uso de determinada espécie em programas de melhoramento genético depende da obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no seu germoplasma (Techio et al., 2006a). A viabilidade polínica é um dos fatores responsáveis pela seleção de genótipos para programas de melhoramentos, e grãos de pólen viáveis influenciam diretamente o sucesso da fertilização (Cabral et al., 2013).

Segundo Pagliarini (2000), o grau de fertilidade das plantas é demonstrado pelo comportamento meiótico. As irregularidades na meiose, que afetam o pareamento cromossômico, são importantes, pois podem levar à esterilidade ou à formação de indivíduos poliploides e aneuploides. Desse modo, a determinação da viabilidade do pólen, para Peñaloza (1995), é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial

de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer. O parâmetro viabilidade do pólen é reflexo das condições de desenvolvimento da parte reprodutiva masculina da planta, uma vez que o pólen viável é um conjunto de gametas masculinos normais, aptos para fertilização (Loguercio & Battistin, 2004).

A estimativa da viabilidade polínica é importante para a análise de fluxo gênico em plantas, porque evidencia o potencial masculino de reprodução da espécie e pode ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (Frescura et al., 2012). O período de florescimento, as alterações ambientais, fatores bióticos e abióticos e as diferenças genotípicas podem contribuir para a viabilidade polínica (Shivanna & Rangaswamy, 1992; Techio et al., 2006a).

Não há na literatura um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico, por isso a importância de se testar mais de um tipo de corante a fim de encontrar o mais adequado para cada espécie. Techio et al. (2006a) comparando os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander observaram viabilidade do grão de pólen superior a 90% em capim-elefante e milho, independente do corante utilizado. Entretanto, Auler et al. (2006), comparando os mesmos três corantes, observaram diferença significativa entre eles, sugerindo o corante reativo de Alexander como o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen na espécie medicinal *Baccharis trimera* (Less) DC. ('carqueja').

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou comparar a eficiência de coloração de dois distintos corantes de grãos de pólen, a saber, orceína acética 2% e reativo de Alexander, permitindo estimar sua viabilidade, buscando a caracterização do germoplasma de *P. cattleianum*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de material botânico**

Durante o período de florescimento da espécie *Psidium cattleianum* Sabine foram coletados botões florais em diversos estágios de desenvolvimento. Os botões coletados foram imediatamente fixados em solução etanol:ácido acético (3:1), por

um período de 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os botões foram transferidos para frascos com etanol 70% e mantidos sob refrigeração até a sua utilização. Os acessos coletados são de diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul – Brasil. De cada acesso, foi depositada uma exsicata no Herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS.

### **Preparo das lâminas e critérios de análise**

Os botões florais de maior tamanho foram os escolhidos para o preparo das lâminas, buscando-se os polens já diferenciados. A técnica de esmagamento das anteras, descrita por Guerra & Souza (2002), foi utilizada no preparo das lâminas. Nesta técnica as anteras são rompidas mecanicamente liberando os grãos de pólen que em seguida passam pelo processo de coloração. A estimativa da viabilidade polínica foi comparada utilizando os seguintes corantes:orceína acética 2% e reativo de Alexander (fucsina ácida + verde de malaquita).

Para cada acesso foram confeccionadas quatro lâminas, duas para cada um dos corantes, avaliando-se 500 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 1000 grãos de pólen analisados por corante para cada um dos acessos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 40X. Utilizando-se a orceína acética, os polens de cor rosa escuro foram considerados viáveis e os não corados ou com morfologia anômala, inviáveis. Em contrapartida, com o reativo de Alexander, os grãos de pólen da cor púrpura foram considerados viáveis e os de cor verde, inviáveis. Também foram contabilizados aqueles que apresentaram tamanho diminuto e/ou formato irregular. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos de pólen viáveis, dividindo-se o número de grãos corados pelo total de grãos e o resultado multiplicado por 100.

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as porcentagens de viabilidade polínica foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade de erro, em arranjo bifatorial (2x20), com o auxílio do programa estatístico Assistat®, versão beta 7.7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação colorimétrica dos grãos de pólen dos diferentes acessos de *P. cattleianum* é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 – Estimativa (%) da viabilidade polínica entre corantes dentro de cada acesso e entre acessos dentro de cada corante, em 20 acessos de *Psidium cattleianum* Sabine provenientes do estado do RS.

Acessos	Número SMDB	Orceína acética 2%	Reativo de Alexander
01 - Santa Maria 1	15.063	98,9% a A*	90,4% b B
02 – Santa Maria 2	15.086	98,6% a A	88,9% c B
03 – Santa Maria 3	15.075	98,6% a A	85,6% d B
04 – Santa Maria 4	15.076	98,2% a A	88,9% c B
05 – Santa Maria 5	15.077	99,6% a A	80,3% e B
06 – Candelária 1	15.073	99,2% a A	97% a A
07 – Candelária 2	15.074	99,3% a A	46,4% f B
08 – Cerro Largo 1	15.072	98,9% a A	83,5% d B
09 – Cerro Largo 2	15.071	98,5% a A	95,4% a A
10 – Cerro Largo 3	15.078	99,4% a A	89% c B
11 – Cerro Largo 4	15.087	99,9% a A	85% d B
12 – Cerro Largo 5	15.069	99,2% a A	90,7% b B
13 – Cerro Largo 6	15.070	98,2% a A	91,8% b B
14 – Silveira Martins 1	15.066	98,7% a A	43% f B
15 – Silveira Martins 2	15.079	99,7% a A	88,6% c B
16 – Formigueiro 1	15.085	99,1% a A	84,7% d B
17 – Formigueiro 2	15.081	98,2% a A	86,9% c B
18 – Formigueiro 3	15.082	98,9% a A	93,8% a B
19 – Formigueiro 4	15.083	99,6% a A	87,2% c B
20 – Formigueiro 5	15.084	98,1% a A	85,2% d B

Letras minúsculas diferentes nas linhas correspondem às diferenças entre os acessos, dentro de cada corante. Letras maiúsculas diferentes nas colunas correspondem às diferenças entre os acessos, entre corantes. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade de erro.



É possível observar que a coloração utilizando a orceína acética 2% (Fig. 1a e 1b) não permitiu a discriminação satisfatória no que diz respeito à estimativa de viabilidade dos polens na maior parte dos acessos estudados. De acordo com os dados observados na Tabela 1, percebe-se que os grãos de pólen corados com orceína acética 2% apresentaram uma alta viabilidade polínica, superior a 97,9%.

As letras minúsculas da Tabela 1 mostram que não houve diferença significativa entre os acessos pelo Teste de Scott-Knott. Em estudos de viabilidade polínica utilizando a orceína acética 2% em populações de plantas medicinais das espécies *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. e *A. triphylla* (L'Her.) Britton, Hister et al. (2010) também observaram altos valores de viabilidade polínica (> 97%). Frescura et al. (2012) demonstraram que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica de *Polygala paniculata* L., devido à dificuldade de distinção entre os grãos de pólen viáveis e não viáveis, sendo que essa avaliação foi realizada basicamente pela diferença de tamanho dos polens.

O corante orceína acética 2% foi escolhido para analisar a viabilidade polínica de *P. cattleianum*, pois a capacidade de coloração com um determinado corante pode variar entre as espécies. Nessa espécie estudada, a orceína acética não se mostrou um bom corante para avaliar a viabilidade polínica. Entretanto, em outras espécies este mesmo corante foi satisfatório na estimativa da viabilidade polínica, como em estudos realizados por Techio et al. (2006a) que, comparando os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander, observou viabilidade do grão de pólen superior a 90% em capim-elefante e milheto, independente do corante utilizado.

Por outro lado, a viabilidade polínica através da coloração com o reativo de Alexander variou de 43% a 97%. Em apenas dois acessos (06 e 09) não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade encontrados através dos dois corantes testados. A maior diferença entre os dois corantes foi encontrada nos acessos 07 (orceína acética = 99,3%; reativo de Alexander = 46,4%) e 14 (orceína acética = 98,7%; reativo de Alexander = 43%). O uso dos distintos corantes, além de mostrar a superestimação da viabilidade ocasionada pelo uso da orceína acética, também revelou que o reativo de Alexander é o mais eficiente e fidedigno no que diz respeito à estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através da capacidade de coloração.

Em *Polygala paniculata*, a viabilidade do pólen determinada pelo reativo de Alexander mostrou valores elevados (> 70%) na maioria dos acessos, no entanto, alguns acessos apresentaram valores inferiores a 70% de viabilidade (Frescura et al., 2012), assim como também observado nos acessos de araçá 07 e 14, sendo considerada uma viabilidade polínica baixa e que pode trazer problemas para a espécie, como infertilidade. Estes baixos valores de viabilidade dos grãos de pólen podem indicar possíveis irregularidades meióticas provocando diferentes graus de esterilidade, como observou Bione et al. (2005) na soja.

Entre os acessos coletados em um mesmo município os que apresentaram maior diferença, pela coloração com reativo de Alexander, foram os do município de Candelária (acesso 07 = 46,4% e acesso 06 = 97%) e Silveira Martins (acesso 14 = 43% e acesso 15 = 88,6%), mostrando que mesmo em acessos não muito distantes espacialmente há uma grande variabilidade genética. Tal característica é importante para a espécie, uma vez que proporciona uma maior adaptabilidade e diferentes respostas frente às mudanças ambientais. A variabilidade genética também é importante no melhoramento, através do qual se obtém características mais adequadas para a exploração comercial. Como destacado por Giudice-Neto et al. (2004), a conservação e o melhoramento genético de uma espécie requerem o conhecimento de seu sistema de reprodução, variabilidade e estrutura genética.

Em estudos realizados por Techio et al. (2006a), com híbridos interespecíficos (*Pennisetum purpureum* x *P. glaucum*), os valores de viabilidade polínica variaram de acordo com o corante empregado. Os corantes nucleares utilizados (orceína acética e carmim propiônico) mostraram alta taxa de polens funcionais (acima de 90%). Essa frequência de polens viáveis não era esperada, uma vez que híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum* são descritos como estéreis devido a irregularidades meióticas (Jauhar, 1968, 1981; Techio et al., 2006b). Por outro lado, o corante de Alexander confirmou que dentre os quatro acessos híbridos interespecíficos avaliados, três apresentaram completa esterilidade. Coelho et al. (2012) analisaram os grãos de pólen de *Crotalaria juncea* L., concluindo que a orceína acética superestimou a viabilidade, ao passo que o reativo de Alexander minimizou os problemas relacionados à obtenção de dados sobre a viabilidade polínica desta espécie.

As análises usando o reativo de Alexander parecem fornecer dados mais acurados sobre a viabilidade do pólen, pois se obtém uma coloração diferencial dos

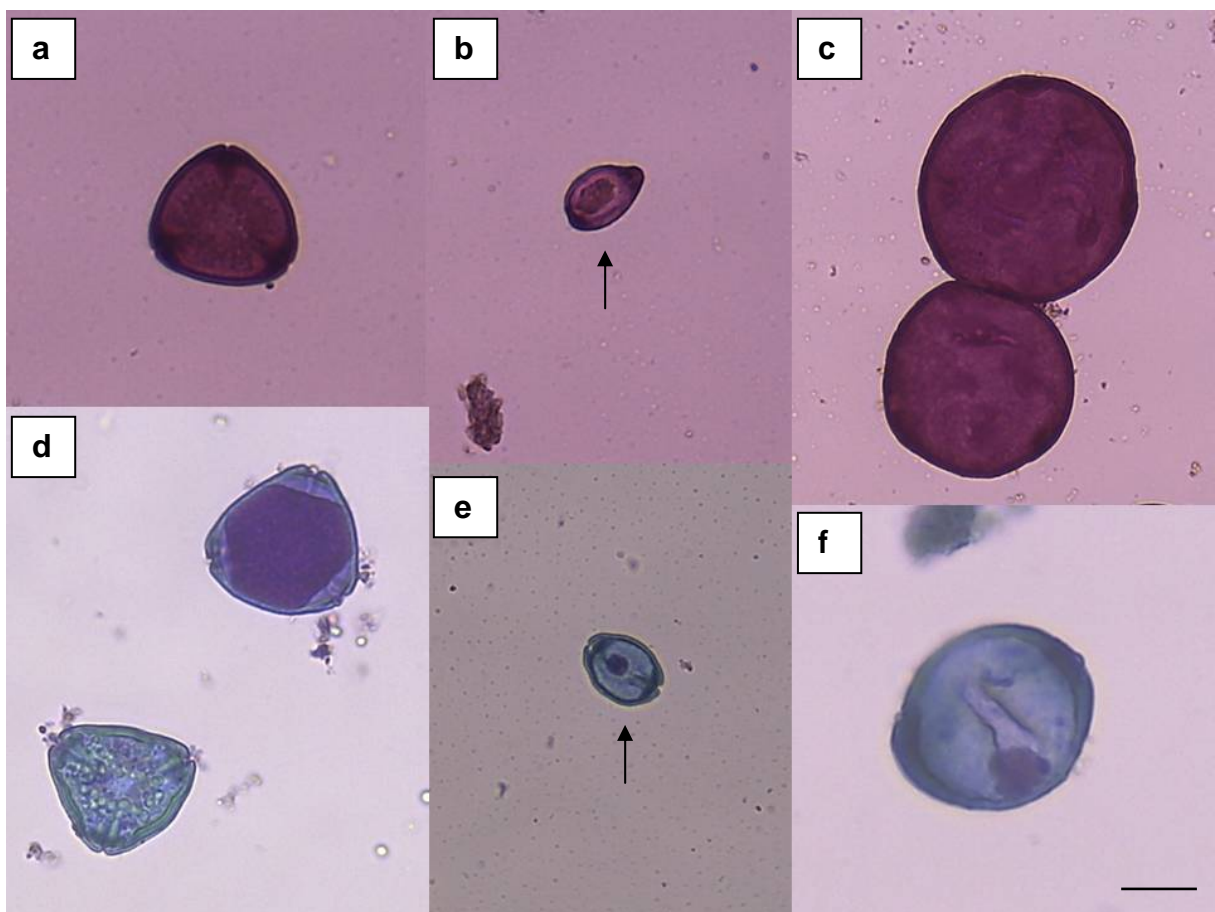
polens viáveis e não viáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam dupla coloração. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida (Fig. 1c e 1d). Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1980).

Em várias espécies do gênero *Psidium* analisadas por Costa (2004), foram encontrados valores elevados de viabilidade de grãos de pólen, com índices superiores a 86%, utilizando o corante carmim acético, pelo método de Medina & Conagin (1964). Entretanto, Raseira & Raseira (1996) em seus estudos sobre germinação do pólen *in vitro* de *P. cattleianum* obtiveram um valor muito baixo de germinação, atingindo no máximo 8,5%, sugerindo novos estudos para determinar se a falha na germinação foi devida à baixa viabilidade ou se houve influência do estágio de desenvolvimento da flor no momento da coleta das anteras. Raseira & Raseira (1996) também encontraram porcentagens baixas de tétrades normais, 65%, o que talvez explicasse a baixa porcentagem germinação dos grãos de pólen. Del Duca (1976) cita trabalhos de outros autores com diversas espécies, como *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult., *Bromus inermis* Leyss. e *Secale cereale* L. que indicam que irregularidades meióticas aparentemente afetam a fertilidade.

Além da avaliação dos grãos de pólen pela capacidade de coloração, também foi avaliado o tamanho e formato dos mesmos. Os grãos de pólen de *P. cattleianum* apresentam forma variada: triangular, arredondada, oval ou disforme, como também foi observado por Raseira & Raseira (1996). Para a espécie em questão, *P. cattleianum*, há relatos na literatura de casos de poliploidia, tendo sido encontrado  $2n = 44$  (Costa & Forni-Martins, 2006b),  $2n = 66$  (Costa, 2009),  $2n = 77$  (Singhal et al., 1985) e  $2n = 88$  (Atchinson, 1947). De acordo com Stanley & Linskens (1974), o tamanho do pólen está relacionado ao número de cromossomos e, geralmente, é constante.

A análise dos grãos de pólen, no que diz respeito ao seu tamanho, revelou a presença de três tamanhos distintos de polens: pequenos = até 0,5 cm de diâmetro (Fig. 1a e 1e), médios = de 0,5 a 1 cm (Fig. 1a, 1c e 1d) e grandes = mais de 1 cm (Fig. 1b e 1f). Os grãos de pólen de tamanho médio foram os observados em maior número, apresentando formato triangular. Os polens de tamanho diminuto, embora

encontrados em pequena quantidade, eram na maioria deles inviáveis. Do mesmo modo, os polens grandes, que em alguns acessos eram bastante numerosos, apareciam com formato arredondado e apresentavam grande inviabilidade. O tamanho do grão de pólen em várias espécies tem relação com o nível de ploidia (Raseira & Raseira, 1996). A relação positiva entre o nível de ploidia e tamanho pólen tem sido relatada para vários gêneros de plantas poliploides, como *Avena* L. (Katsiotis & Forsberg, 1995), *Mentha* L. (Celenk et al. 2008) e *Lippia* L. (Sousa et al. 2013).



**FIGURA 1** – Grãos de pólen submetidos a diferentes métodos de coloração. Orceína acética 2%: a) Grão de pólen viável tamanho médio (de 0,5 a 1 cm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); b) pólen diminuto - seta (tamanho menor que 0,5 cm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); c) Polens viáveis de tamanho grande (maior que 1 cm) – acesso 13 (Cerro Largo 6). Reativo de Alexander: d) Pólen viável e inviável de tamanho médio (acesso 10 - Cerro Largo 3); e) Pólen inviável, tamanho pequeno – (acesso 13 - Cerro Largo 6); f) Pólen de tamanho grande, inviável (acesso 14 - Silveira Martins 1). Escala: 10µm.

Entretanto, a presença de conteúdo celular, como pode ser observada pela coloração púrpura fornecida pelo reativo de Alexander, não garante que o pólen é

metabolicamente ativo ou capaz de crescer em tubos polínicos (Rodrigues et al. 2006). Através da análise colorimétrica torna-se possível realizar somente a estimativa da viabilidade do pólen (no caso, capacidade de coloração). Mas ressalta-se que a fertilidade do pólen é determinada por testes de germinação e crescimento do tubo polínico ou por meio de testes fluorocromáticos. O corante de Alexander e os testes de germinação *in vitro* confirmaram a completa esterilidade dos grãos de pólen de três dos acessos híbridos interespecíficos (*Pennisetum purpureum* x *P. glaucum*) avaliados por Techio et al. (2006a).

No contexto da variabilidade genética de plantas medicinais Scheffer et al. (1999) ressaltaram a importância da variabilidade interespecífica e intraespecífica, em especial das espécies nativas. Segundo os autores, a variabilidade existente é o resultado da pressão ambiental nos diversos biomas, produzindo características que são muito importantes nos trabalhos de conservação.

Através desse estudo, utilizando os corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander para determinação da viabilidade polínica em acessos de *Psidium cattleianum*, conclui-se que o reativo de Alexander mostra-se mais eficaz para diferenciação entre grãos de pólen viáveis e não viáveis. Utilizando o reativo de Alexander, na maioria dos acessos a viabilidade polínica é alta (superior a 80,3%). Em apenas dois acessos a viabilidade polínica foi inferior a 70%, o que é considerado baixo e pode trazer problemas de infertilidade.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.P.A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.1, n.5, p. 13-8, 1980.

ALICE, C.B. et al. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Ulbra, 1995. 205 p.

ATCHINSON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**. v. 34, n. 3, p. 159-164, 1947.

AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis*

*trimer* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicin**ais, v.8, p. 55-63, 2006.

BIONE, N.C.P.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, L.A. A male-sterile mutation in soybean (*Glycine max*) affecting chromosome arrangement in metaphase plate and cytokinesis. **Biocell**, v.29, p. 177-181, 2005.

BOSCOLO, O.H.; VALLE, L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277, jul./dez. 2008.

CABRAL, J.C.; ROSSI, A.A.B.; KLEIN, M.E.; VIEIRA, F.S.; GIUSTINA, L.D. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes calorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17; p. 2780-2788, 2013.

CASAGRANDE JÚNIOR, J.G. et al. Efeito de materiais orgânicos no crescimento de mudas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n. 3, p. 187-191, set./dez. 1996.

CELENK, S. et al. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.157, p. 141-154, 2008.

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

COSTA, I.R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. 2004. 80p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSTA, I.R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. 2009. 234p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSTA, I.R.; FORNI-MARTINS E.R. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pavon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia**, v.59, n.1, p. 7-13, 2006a.

COSTA, I.R.; FORNI-MARTINS E.R. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. **Australian Journal of Botany**, v.54, p. 409-415, 2006b.

DEL DUCA, L.J.A. **Índices meióticos em trigos brasileiros e estudos comparativos entre comportamento citológico, fatores ambientais e componentes de produção**. 1976. 139p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRANZON, R.C. **Caracterização de mirtáceas nativas do sul do Brasil**. 2004. 114p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FRANZON, R.C. et al. **Araçás do gênero *Psidium***: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 48 p.

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

GIUDICE-NETO, J. Del; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Herança e ligação em locos izoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 101-110, dez. 2004.

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

HISTER, C.A.L. et al. Meiotic behavior and pollen viability of *Aloysia gratissima* and *Aloysia triphylla* (Verbenaceae). **Ciência e Natura**, v.32, p. 37-47, 2010.

JAUHAR, P.P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, v.39, p. 360-370, 1968.

JAUHAR, P.P. Cytogenetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, v.34, p. 407-479, 1981.

KATSIOTIS, A.; FORSBERG, R.A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, v.83, n.2, p. 103-108, 1995.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.11, n.1, p. 95-106, 2004.

MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. **Técnica Citológica**. Publicação n. 2610, Campinas: Instituto Agrônômico, 1964, 107p.

NACHTIGAL, J.C. **Propagação de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) através de estacas semilenhosas**. 1994. 66p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p. 997-1002, 2000.

PEÑALOZA, A.P.S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. 1995. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.

RASEIRA, M do C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum***. Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. 95p.

RIBEIRO, M.S. **Multiplicação e enraizamento *in vitro* de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) cultivar Irapuã**. 2007. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RODRIGUES, L.R.; FORTE, B.C.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Isolation and culture of soybean microspores and pollen grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p. 537-545, 2006.

RYE, B. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. **Australian Journal of Botany**, v.27, p. 547-573, 1979.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. de. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.;



RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaisconservacao.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2015.

SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology** - A laboratory manual. Berlin: Springer- Verlag, 1992, 119p.

SINGHAL, V.K.; GILL, B.S.; BIRR, S.S. Cytology of woody species. **Proceedings of the Indian Academy Sciences (Plant Sciences)**, v.94, p. 607-617, 1985.

SOUSA, L.P.; SOBRAL, M.E.G. Morfotipos do Araçazeiro, *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) no Estado do Paraná. *In*: PEDROSA-MACEDO, J. H. et al. (Orgs). **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**. Curitiba, PR: FUPEF, 2007, p. 19-28.

SOUSA, S.M. et al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.1, p. 147-157, 2013.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Biology Biochemistry Management**. Berlin: Heidelberg, 1974, 307p. Disponível em: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-642-65905-8>. Acesso em: 19/01/2015.

TECHIO, V.H. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, Maringá, v.28, n.1, p. 7-12, jan./mar. 2006a.

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

TEDESCO, S.B. **Morfologia, microsporogênese e modo de reprodução das espécies brasileiras do gênero *Adesmia* DC. (Leguminosae)**. Porto Alegre, 2000. 163 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

## DISCUSSÃO

A avaliação de possíveis efeitos adversos causados por extratos de plantas medicinais merece atenção especial, pois o desconhecimento da constituição química associado ao consumo indiscriminado de chás ou derivados podem causar, muitas vezes, mais danos à saúde que benefícios.

O teste *in vivo* utilizando o suco de frutos de *Psidium cattleianum* mostraram atividade proliferativa e genotóxica sobre a divisão celular de *Allium cepa*. Os resultados da avaliação de genotoxicidade dos sucos de araçá foram surpreendentes, uma vez que os mesmos também inibiram as fibras do fuso mitótico, tendo como resultado o aparecimento de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* com os cromossomos dispersos pelo citoplasma. Células com esse padrão de espalhamento de cromossomos, permitindo sua contagem, apenas são obtidas após um processo chamado de pré-tratamento que na maioria das vezes utiliza compostos químicos como: paradiclorobenzeno (PEREIRA et al., 2006; FACHINETTO; TEDESCO, 2009), 8-hidroxiquinoleína (ORTIZ et al., 2013), colchicina (YÜZBAŞIOĞLU; ÜNAL, 2004) ou então o pré-tratamento a frio. O espalhamento dos cromossomos no citoplasma é importante em estudos que buscam a contagem do número de cromossomos de uma espécie.

A grande quantidade de irregularidades encontradas durante o ciclo celular de *A. cepa*, principalmente nas células em metáfase, está relacionada a algum componente presente nos sucos, não sendo possível afirmar qual exatamente, que parece inibir a formação das fibras do fuso mitótico, impedindo que a divisão prossiga de maneira correta, caracterizando um efeito citotóxico. Talvez algum composto presente na polpa ou na casca dos frutos possa ter essa ação antimitótica ou a sinergia entre os compostos, uma vez que Medina et al. (2011) fez experimentos com frutos de *P. cattleianum* sem sementes e verificou atividade antiproliferativa frente a células humanas de câncer de mama e de cólon.

A presença de substâncias capazes de inibir as fibras do fuso mitótico é importante, pois possivelmente tais substâncias poderão ser utilizadas em estudos futuros sobre outras células eucarióticas, buscando alternativas para inibição de células com capacidade proliferativa ilimitada, como no caso das cancerígenas. Por

exemplo, a epicatequina, flavonoide presente nos sucos de araçá, possui propriedade antioxidante e inibidora do processo de carcinogênese, segundo Bianchi e Antunes (1999).

O sistema-teste de *A. cepa* também foi utilizado para análise dos extratos aquosos de folhas de quatro acessos de *P. cattleianum*, cujo resultado mostrou que estes possuem efeito antiproliferativo sobre as pontas de raízes de cebola. E quanto maior a concentração do chá, menor o índice mitótico (IM) encontrado. Mutações foram observadas nas células de raízes de cebolas tratadas com os extratos dos quatro acessos, na concentração mais baixa ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ), porém estas não foram significativas em relação ao controle negativo, podendo-se considerar os acessos dos municípios de Segredo (SE), Tupanciretã (TU) e Silveira Martins (SiM) não genotóxicos, e o acesso de Cerro Largo (CL), na concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , genotóxico. Observações similares foram realizadas por Lubini et al. (2008), mostrando efeitos antiproliferativos de *Psychotria myriantha* e *P. leiocarpa* sobre a divisão celular de pontas de raízes de cebola, sendo que a primeira também apresentou atividade genotóxica.

O efeito antiproliferativo do glifosato foi parcialmente revertido pelo extrato aquoso das folhas do acesso SiM ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ), além disso, também ocorreu a diminuição significativa da ocorrência de irregularidades em relação ao pós-tratamento com água destilada, sendo este acesso considerado antimutagênico. Reversão parcial do efeito antiproliferativo do glifosato também foi relatado em estudo utilizando extrato aquoso das espécies *Psychotria brachypoda* e *P. birotula* como tratamento de recuperação após o glifosato (FRESCURA et al. 2013).

Outras espécies já foram testadas em diferentes concentrações com o teste de *A. cepa* e a maior concentração inibiu a divisão celular, como por exemplo: *Psidium guajava* L. e *Achillea millefolium* L. (TEIXEIRA et al., 2003) *Pterocaulon polystachyum* DC (KNOLL et al., 2006); *Azadirachta indica* (A. Juss), *Morinda lucida* (Benth.), *Cymbopogon citratus* (DC Stapf.), *Mangifera indica* (Linn.) e *Carica papaya* (Linn.) (AKINBORO; BAKARE, 2007); *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (FACHINETTO et al., 2007); *Solidago microglossa* DC (BAGATINI et al., 2009); *Baccharis trimera* (Less.) DC. e *B. articulata* (Lam.) Pers. (FACHINETTO; TEDESCO, 2009) e *Mikania glomerata* Spreng. (DALLA NORA et al., 2010).

Gan e Ye (2006) relataram que a análise dos extratos das plantas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido utilizada para verificar a

autenticidade ou fornecer o controle de qualidade das plantas medicinais, pois fornece um perfil químico sob a forma de um cromatograma. A análise cromatográfica dos extratos aquosos das folhas dos araçazeiros mostrou a predominância de quercetina e quercitrina. Compostos fenólicos, tais como o flavonoide quercitrina, encontrados nas folhas de *P. cattleianum*, têm como propriedade benéfica o sequestro de radicais livres (DECKER, 1997). Efeitos antiproliferativos e mutagênicos dos flavonoides foram relatados por pesquisadores que fizeram uso do sistema-teste *A. cepa* em estudos com plantas que apresentam esse grupo de compostos fenólicos em sua constituição, como Santos e Salatino (2000); Labieniec et al. (2003); Knoll et al. (2006) e Fachinetto et al. (2007).

Além de ser utilizado como bioindicador de genotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais, o teste de *A. cepa* também tem sido utilizado para muitos outros estudos diferentes. Bagatini et al. (2009) avaliou o efeito de efluentes hospitalares sobre o ciclo celular da cebola. O teste também pode ser utilizado no monitoramento de contaminantes de águas superficiais e solo (RANK; NIELSEN, 1993; MA et al., 1995; CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; MATSUMOTO et al., 2006; GANA et al., 2008).

O sistema-teste *Allium cepa*, por ser responsável pela primeira apuração da genotoxicidade, é um bioindicador viável quando se estuda a prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI et al., 2007). Estudos de correlação entre os sistemas de teste são fundamentais para uma avaliação mais precisa dos prováveis riscos, bem como a extrapolação de dados a outros organismos alvo, como por exemplo, o homem. Rank e Nielsen (1993) mostraram uma correlação de 82% do ensaio com *A. cepa* em relação ao ensaio de carcinogenicidade em roedores. A pesquisa de possíveis efeitos nocivos causados por substâncias presentes em plantas utilizadas na medicina popular serve de alerta de segurança à população em geral.

Além da análise da genotoxicidade de *P. cattleianum*, também foi realizado um estudo de seus grãos de pólen. A estimativa de viabilidade polínica de uma espécie é importante para sua melhor caracterização, auxiliando no descobrimento de possíveis causas de infertilidade, pois grãos de pólen viáveis influenciam diretamente o sucesso da fertilização (CABRAL et al., 2013). A estimativa da viabilidade polínica também é importante para a análise de fluxo gênico em plantas, porque evidencia o potencial masculino de reprodução da espécie e pode ser útil em

estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (FRESCURA et al., 2012).

Como na literatura não existe um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico, a comparação entre os corantesorceína acética 2% e reativo de Alexander trouxe resultados importantes para o estudo do pólen de *P. cattleianum*. Aorceína acética não permitiu a discriminação no que diz respeito à estimativa de viabilidade dos polens na maior parte dos acessos estudados. Os grãos de pólen, dos 20 acessos de araçá analisados, corados comorceína acética 2% apresentaram viabilidade superior a 97,9% e não ocorreu diferença significativa entre os acessos pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Em outros estudos utilizando aorceína acética 2% em populações de plantas medicinais foram observadas altos valores de viabilidade polínica, provavelmente uma superestimação desses valores pela dificuldade de distinção entre polens viáveis e inviáveis: *Baccharis trimera* (AULER et al., 2006); *Aloysia gratissima* e *A. triphylla* (HISTER et al., 2010); *Polygala paniculata* (FRESCURA et al., 2012)

Por outro lado, a coloração com o reativo de Alexander mostrou-se mais eficiente na diferenciação dos grãos de polens devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam dupla coloração. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (ALEXANDER, 1980). A viabilidade polínica nos acessos de *P. cattleianum* variou de 43% a 97%, mostrando que há variabilidade genética entre os acessos. Em apenas dois acessos (06 e 09) não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade encontrados através dos dois corantes testados.

Diferentes autores, utilizando o reativo de Alexander, também concluíram que o mesmo é mais eficiente na diferenciação entre grãos de pólen viáveis e não viáveis de diversas espécies, como: *Stylosanthes viscosa* Sw., *S. montevidensis* Vog. e *S. leiocarpa* Vog. (BATTISTIN; MATTOS, 2002); *Baccharis trimera* (Less.) DC. (AULER et al., 2006); híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum* (TECHIO et al., 2006); *Crotalaria juncea* L. (COELHO et al., 2012).

Além da avaliação dos grãos de pólen pela capacidade de coloração, também foi avaliado o tamanho e formato dos mesmos. Os grãos de pólen de *P. cattleianum* apresentam forma variada: triangular, arredondada, oval ou disforme, como também

foi observado por Raseira e Raseira (1996). A análise dos grãos de pólen, no que diz respeito ao seu tamanho, revelou a presença de três tamanhos distintos de polens: pequenos (até 0,5 cm de diâmetro), médios (de 0,5 a 1 cm) e grandes (mais de 1 cm). O tamanho do grão de pólen em várias espécies tem relação com o nível de ploidia (RASEIRA; RASEIRA, 1996). A relação positiva entre o nível de ploidia e tamanho pólen tem sido relatada para vários gêneros de plantas poliploides, como *Avena* L. (KATSIOTIS; FORSBERG, 1995), *Mentha* L. (CELENK et al. 2008) e *Lippia* L. (SOUSA et al. 2013).

Através da análise colorimétrica torna-se possível realizar somente a estimativa da viabilidade do pólen (no caso, capacidade de coloração). Mas ressalta-se que a fertilidade do pólen é determinada por testes de germinação e crescimento do tubo polínico ou por meio de testes fluorocromáticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os frutos de *Psidium cattleianum* possuem atividade proliferativa e genotóxica sobre a divisão meristemática de *Allium cepa*, o que pode ser extrapolado para outros tipos celulares eucarióticos. A preocupação desses resultados refere-se à saúde humana, sendo que a população consome os frutos de araçá *in natura* e também faz uso dos mesmos a partir de polpas congeladas. Recomenda-se cautela em relação ao uso indiscriminado de araçá na forma de sucos de seus frutos.

O suco dos frutos de *P. cattleianum*, por também apresentarem ação sobre a formação das fibras do fuso mitótico, pode ser utilizado como pré-tratamento para obtenção de células em metáfases mitóticas na área de citogenética vegetal devido à sua ação antimitótica. Esse estudo, portanto, nos apresenta uma nova maneira de obtenção de células em metáfase mitóticas, as quais podem ser obtidas sem o uso de produtos químicos. Faz-se necessário realizar mais estudos para indicar qual ou quais os compostos responsáveis pela ação antimitótica apresentada pelos frutos de araçá sobre a divisão celular de *Allium cepa*.

Os extratos aquosos das folhas de *P. cattleianum* possuem efeito antiproliferativo sobre as pontas de raízes de *A. cepa*. E quanto maior a concentração do chá, menor o índice mitótico (IM) encontrado. Os extratos aquosos produzidos com as folhas coletadas nos acessos dos municípios de Segredo (SE), Tupanciretã (TU) e Silveira Martins (SiM) são considerados não genotóxicos, ao passo que o extrato aquoso das folhas coletadas no acesso em Cerro Largo (CL), na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, é considerado genotóxico, uma vez que apresentou um número razoável de alterações cromossômicas.

Os compostos secundários de plantas medicinais variam consideravelmente de acordo com vários fatores, provavelmente influenciando o seu valor terapêutico. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do suco dos frutos de *P. cattleianum* mostrou a predominância de epicatequina em dois acessos (DAG – Distrito de Arroio Grande e UFSM – Universidade Federal de Santa Maria), enquanto no outro acesso houve predominância de isoquercitrina (DP – Distrito de Palma). A CLAE dos extratos aquosos das folhas mostrou a predominância de quercetina em

três acessos (SE – Segredo, TU – Tupanciretã e SiM – Silveira Martins) e quercitrina em um dos acessos (CL – Cerro Largo).

Os resultados obtidos pelos testes colorimétricos em 20 acessos de *P. cattleianum* utilizando dois distintos corantes – orceína acética 2% e reativo de Alexander – para determinação da viabilidade polínica, revelaram que o segundo foi mais eficaz para diferenciação entre grãos de pólen viáveis e não viáveis. Utilizando o reativo de Alexander, na maioria dos acessos a viabilidade polínica é alta (superior a 80,3%). Em apenas dois acessos estudados (acesso 07 – Candelária 2 e acesso 14 – Silveira Martins 1), a viabilidade polínica foi inferior a 70%, o que é considerado baixo e pode trazer problemas de infertilidade.



## REFERÊNCIAS

AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 470–475, 2007.

ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extract: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p.1-8, 2007.

ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.1, n.5, p. 13-8, 1980.

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra, 1995. 205 p.

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

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

BAGATINI, M. D. et al. Biomonitoring hospital effluents by *Allium cepa* L. Test. **Bulletin of Environmental Toxicology and Contamination**, v. 82, p. 590-592, 2009.

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

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

CABRAL, J. C.; ROSSI, A. A. B.; KLEIN, M. E.; VIEIRA, F. S.; GIUSTINA, L. D. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes calorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17; p. 2780-2788, 2013.

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

CASAGRANDE JR., J. G. et al. Efeito de materiais orgânicos no crescimento de mudas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n. 3, p. 187-191, set./dez. 1996.

CELENK, S. et al. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.157, p. 141-154, 2008.

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

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

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

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, 2007.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 110-116, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x/pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

FRANZON, R. C. **Caracterização de mirtáceas nativas do sul do Brasil**. 2004. 114 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

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

FRESCURA, V. D. et al. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. **Biocell**, v. 37, n. 2, p. 23-28, 2013.

GAN, F.; YE, R. New approach on similarity of chromatography fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 100-105, 2006.

GAN, J. M. et al. Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, p. 403–406, 2008.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 142p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.), **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 13-28.

HISTER, C. A. L. et al. Meiotic behavior and pollen viability of *Aloysia gratissima* and *Aloysia triphylla* (Verbenaceae). **Ciência e Natura**, v.32, p. 37-47, 2010.

KATSIOTIS, A.; FORSBERG, R. A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, v.83, n.2, p. 103-108, 1995.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006.

KUHN, A. W. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cyto genetics**, v. 68, n.1, p. 25-30, 2015.

LABIENIEC, M. et al. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. **Mutation Research** [S.I.], v. 539, n. 1-2, p. 19-28, Aug. 2003.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, XXIV, p. 471-486, 1938. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H.; SARTORI, S. F.; BATCHER, L. B.; LACERDA, M. T. C. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006. 712p.

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

MA, T. H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARCHIORI, J. N. C.; SANTOS, S.R. Estudo anatômico do lenho de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae). **Balduinia** (UFSM), v. 18, p. 15-19, 2009.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 2003, 220 p.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.

NACHTIGAL, J. C. **Propagação de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de estacas semilenhosas**. 1994. 66 f. Dissertação (Mestrado em

Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1994.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

ORTIZ, A. M.; SILVESTRI, M. C.; LAVIA, G. I. Karyotypic studies in wild species of *Arachis* (Leguminosae) belonging to sections Erectoides, Procumbentes and Rhizomatosaes. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 48, n. 2, p. 295-300, 2013.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.

PEÑALOZA, A.P.S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. 1995. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1995.

PEREIRA, L. P. et al. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 678-681, 2006.

RAI, L. K.; PRASAD, P.; SHARMA, E. Conservation threats to some important medicinal plants of the Sikkim Himalaia. **Biological Conservation**, v. 93, p. 27-33, 2000.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, **Hereditas**, v. 18, p. 49–53, 1993.

RASEIRA, M do C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado. Pelotas, RS: EMBRAPA-CPACT, 1996. 95p.

RIBEIRO, M. S. **Multiplicação e enraizamento in vitro de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) cultivar Irapuã**. 2007. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2007.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry** [S.l.], v. 55, n. 6, p. 567-73, nov. 2000.

SOUSA, S. M. e al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.1, p. 147-157, 2013.

SOUSA, L.P.; SOBRAL, M.E.G. Morfotipos do Araçazeiro, *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) no Estado do Paraná. *In*: PEDROSA-MACEDO, J. H. et al. (Orgs). **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**. Curitiba, PR: FUPEF, 2007, p. 19-28.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**. 2005. 89 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.

TECHIO, V. H. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Revista Acta Scientia Biologica**, Maringá, v.28, n.1, p. 7-12, jan./mar. 2006.

TEDESCO, S. B. **Morfologia, microsporogênese e modo de reprodução das espécies brasileiras do gênero *Adesmia* DC. (Leguminosae)**. Porto Alegre, 2000. 163 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

TEDESCO, M. et al. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1913-1919, 2012.

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

VARELLA, M.X.S.; SANTOS, C.A.M.; DUARTE, M.R. Caracteres morfoanatômicos e constituintes químicos de folha de araçazeiro-morfotipos de fruto vermelho e amarelo, in: J.H. Pedrosa-Macedo, A. DalMolin, C.W. Smith (Orgs.), **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**, Curitiba, FUPEF, 2007, p. 39-45.

VOLPATO, A. M. M. **Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Org.), **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Brasil: Argos, 2001, p. 18-44.

YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F. Karyotyping, C- and nor banding of *Allium sativum* L. (Liliaceae) cultivated in Turkey. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 343-349, 2004.