

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, COMPOSTOS
FENÓLICOS E GENOTOXICIDADE DE *Sambucus
australis* CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marília Tedesco

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, COMPOSTOS
FENÓLICOS E GENOTOXICIDADE DE *Sambucus
australis* CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)**

Marília Tedesco

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. Dr. Antonio Carlos Ferreira da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

TEDESCO, MARÍLIA
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, COMPOSTOS FENÓLICOS E
GENOTOXICIDADE DE *Sambucus australis* CHAM. & SCHLTDL.
(ADOXACEAE) / MARÍLIA TEDESCO.-2015.
75 f.; 30cm

Orientador: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2015

1. *Sambucus australis* CHAM. & SCHLTDL. 2. Teste de
Allium cepa 3. Compostos fenólicos 4. Comportamento
meiótico 5. Viabilidade polínica I. FERREIRA DA SILVA,
ANTONIO CARLOS II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Marília Tedesco. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

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

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, COMPOSTOS
FENÓLICOS E GENOTOXICIDADE DE *Sambucus
australis* CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)**

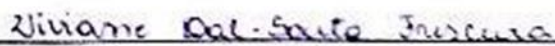
Elaborada por
Marília Tedesco

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

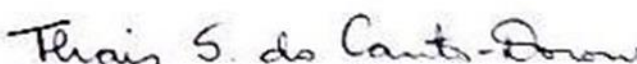
COMISSÃO EXAMINADORA:



Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)



Viviane Dal-Souto Frescura, Dr.^a. (UFSM)



Thais Scotti do Canto-Dorow, Dr.^a. (UNIFRA)

Santa Maria, 13 de março de 2015.

Aos meus pais, Dérry e Greice (in memoriam), que são a base da minha vida e o motivo pelo qual eu sigo em frente todos os dias.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a realização deste trabalho:

À minha mãe, Greice (*in memoriam*), que mesmo não estando presente fisicamente, guia e ilumina todos os meus passos e é a principal razão de eu ter chegado até aqui.

Ao meu pai, Dérry, que é muito mais que um pai, estando presente em todos os momentos da minha vida, me incentivando a nunca desistir e acreditando sempre em mim e no meu potencial.

Ao meu irmão Lucas, que mesmo estando um pouco distante, sempre me apoiou com seu bom-humor e carinho.

Ao professor Antonio, pela orientação, apoio e dedicação, e por ser sempre solícito quando precisei.

À professora e querida tia Solange, por ceder o Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade para condução dos experimentos, por acompanhar todos os momentos da minha pesquisa e me ajudar e apoiar sempre que precisei.

À querida professora Thais Scotti do Canto-Dorow, pela imensa e fundamental ajuda com as coletas e identificação da espécie que trabalhei.

Ao CNPq e à CAPES pela bolsa concedida.

À professora e amiga Viviane Dal-Souto Frescura, pela paciência e dedicação no auxílio com as análises estatísticas deste trabalho e por estar sempre disposta para qualquer outro tipo de ajuda.

À querida amiga (e célula companheira) Andrielle, por todo companheirismo, amizade, momentos de diversão, ajuda e carinho durante a faculdade e o mestrado.

Aos demais amigos do LABCITOGEN, Ana Paula, Carmine, Felipe, Karine (anexo do Lab), Kássia, Jéssica e Leonardo, por serem muito mais que colegas de laboratório, sendo os responsáveis por tornar os dias de trabalho muito mais divertidos.

Às queridas amigas, Ana e Gabi, que sempre me apoiaram quando precisei e entenderam minhas ausências.

Aos colegas do mestrado em Agrobiologia, que contribuíram para que esta etapa se realizasse, demonstrando amizade e companheirismo.

À todos que, de alguma forma ou outra, ajudaram na realização desse trabalho.

O meu sincero MUITO OBRIGADA!

“DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

(Mário Quintana)

RESUMO

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

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, COMPOSTOS FENÓLICOS E GENOTOXICIDADE DE *Sambucus australis* CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)

AUTORA: MARÍLIA TEDESCO
ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA
Data e local da defesa: Santa Maria, RS, 13 de março de 2015.

O potencial econômico de espécies medicinais nativas no Brasil é imenso, sendo necessário conservar a diversidade genética vegetal disponível através de estudos de caracterização de germoplasma. Entre esses estudos, destacam-se a caracterização meiótica, a viabilidade polínica, a análise da atividade genotóxica e antiproliferativa, além da determinação dos compostos fenólicos. Dentre as espécies nativas com potencial medicinal, *Sambucus australis* Cham. & Schldtl. (sabugueiro) tem grande popularidade no tratamento sintomático de moléstias eruptivas, gripes e resfriados, por suas ações diaforética, anti-inflamatória e analgésica. O presente trabalho teve por objetivo verificar a atividade antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica de extratos aquosos de dois acessos de *S. australis*, através do teste de *Allium cepa*, bem como determinar os compostos fenólicos presentes nesses extratos, além de analisar o comportamento meiótico e estimar a viabilidade polínica de diferentes acessos de *S. australis* coletados no Rio Grande do Sul. Para determinação das atividades antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica, foi avaliado o efeito dos extratos aquosos das inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis*, nas concentrações de 3 g.L⁻¹ e 12 g.L⁻¹, sobre o ciclo celular de *A. cepa*. Os compostos fenólicos presentes nesses extratos foram determinados por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a análise da meiose, foram preparadas lâminas pela técnica de esmagamento das anteras retiradas dos botões florais, observando-se as fases de associação e distribuição dos cromossomos, sendo também determinados os índices meióticos. Para estimativa da viabilidade polínica, as lâminas foram preparadas por esmagamento das anteras, comparando-se três corantes:orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A partir dos resultados, pode-se observar que os extratos aquosos de *S. australis* apresentaram atividade antiproliferativa sobre o ciclo celular de *A. cepa*. Os extratos preparados a partir das folhas de *S. australis* (12g.L⁻¹), em ambos acessos, também apresentaram atividade antigenotóxica. A partir da análise cromatográfica foi possível determinar a presença dos seguintes compostos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol. Por fim, os acessos de *S. australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, número gamético $n=19$, índice meiótico superior a 90% e alta viabilidade polínica, sendo o corante reativo de Alexander o mais eficiente para estimar a viabilidade polínica na espécie.

Palavras-chave: Sabugueiro. Caracterização citogenética. Teste de *Allium cepa*. Grãos de pólen. Comportamento meiótico.

ABSTRACT

Master Science Dissertation
Graduate Program in Agrobiolology
Universidade Federal de Santa Maria

CYTOGENETIC CHARACTERIZATION, PHENOLIC COMPOUNDS AND GENOTOXICITY OF *Sambucus australis* CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)

AUTHOR: MARÍLIA TEDESCO
ADVISER: ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA
Santa Maria march 13, 2015.

The economic potential of the medicinal species native to Brazil is huge, rendering it important to maintain the available plant genetic diversity via studies characterizing germplasm. Between these studies, highlights the characterization meiotic and pollen viability, genotoxic and antiproliferative activities, beyond determination of phenolic compounds. *Sambucus australis* Cham. & Schtdl. ("sabugueiro") numbers among the native species with medicinal potential, being widely used in the treatment of symptoms of skin eruptions, influenzas and common colds, for its diaphoretic, anti-inflammatory and analgesic actions. The objective of the present study was to investigate the antiproliferative, genotoxic and antigenotoxic activity of aqueous extracts of two accesses of *S. australis*, using the *Allium cepa* test, and to determine the phenolic compounds present in these extracts, as well as to analyze the meiotic behavior and estimate the pollen viability of different accesses of *S. australis* collected in Rio Grande do Sul state. Antiproliferative, genotoxic and antigenotoxic activities were determined by assessing the effect of aqueous extracts from the inflorescences and leaves of two accesses of *S. australis*, at concentrations of 3 g.L⁻¹ and 12 g.L⁻¹, on the cellular cycle of *A. cepa*. High performance liquid chromatography (HPLC) was employed to determine the phenolic compounds present in the extracts. For the meiosis analysis, slides were prepared by squashing technique of the anthers removed from the flower buds. The phases of association and distribution of the chromosomes were observed and meiotic indexes determined. To estimate pollen viability, the slides were prepared by squashing the anthers, comparing three stains: 2% acetic-orcein, 2% acetic-carmin, and Alexander's reaction. All statistical analyses of the data were performed using the Scott-Knott test (p<0.05). Results showed that the aqueous extracts of *S. australis* exerted antiproliferative activity on the cellular cycle of *A. cepa*. The extracts prepared from *S. australis* (12g.L⁻¹) leaves, for both accesses, also exhibited antigenotoxic activity. Chromatographic analysis disclosed the presence of the following compounds: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, quercitrin, isoquercitrin, quercetin and kaempferol. Ultimately, the accesses of *S. australis* studied exhibited regular meiotic behavior, gametic number n=19, meiotic index > 90% and high pollen viability, being stain Alexander's reaction the most efficient to estimate pollen viability in the specie.

Keywords: Sabugueiro. Cytogenetic characterization. *Allium cepa* test. Pollen grains. Meiotic behavior.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 – Células de raízes de *Allium cepa* L. submetidas aos extratos aquosos de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. A - setas indicando pontes anafásicas (células tratadas com extratos aquosos das inflorescências 3 g.L⁻¹, acesso 1); B - setas indicando pontes anafásicas (células tratadas com glifosato 1%); C - seta indicando telófase com ponte (células tratadas com glifosato 1%); D - seta indicando cromossomo perdido (células tratadas com extratos aquosos das inflorescências 12 g.L⁻¹, acesso 2); E - seta indicando quebra cromossômica (células tratadas com glifosato 1%); F - seta indicando micronúcleos (células tratadas com glifo + 24 horas folhas 12 g.L⁻¹, acesso 2). Escala de 10µm 39
- Figura 2 – Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos aquosos das inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. dos dois acessos estudados (Acesso 1: Santa Maria – RS; Acesso 2: Erechim – RS). Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), rutina (pico 5), quercitrina (pico 6), isoquercitrina (pico 7), quercetina (pico 8) e canferol (pico 9)..... 41

ARTIGO 2

- Figura 1 – Comportamento meiótico de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. – células normais. A) diacinese (19II), acesso TUP10 (Tupanciretã); B) diacinese (19II), acesso SIL14 (Silveira Martins); C) metáfase I, acesso SM02 (Santa Maria); D) anáfase I, acesso SIL15 (Silveira Martins); E) metáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); F) anáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); G) Telófase II, acesso SM05 (Santa Maria); H) Tétrade, acesso SM04 (Santa Maria); I) Tétrade, acesso ITA16 (Itaara). Escala de 10µm..... 60
- Figura 2 – Comportamento meiótico de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. – células anormais. A) diacinese (17II+1IV) com tetravalente (seta), acesso FOR09 (Formigueiro); B) metáfase I com cromossomo retardatário (seta), acesso SM02 (Santa Maria); C) metáfase I com cromossomo retardatário (seta), acesso SIL13 (Silveira Martins); D) anáfase I com ponte (seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); E) telófase I com ponte (seta), acesso ITA16 (Itaara); F) anáfase II com ponte (seta), acesso SIL14 (Silveira Martins); G) Anáfase II com não-disjunção dos cromossomos, acesso SM02 (Santa Maria); H) telófase II com fuso multipolar e micronúcleo (seta), acesso SM05 (Santa Maria); I) Tríade, acesso TUP11 (Tupanciretã). Escala de 10µm.61
- Figura 3 – Polens viáveis e inviáveis de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. A – C: polens corados com reativo de Alexander. A) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); B) pólen inviável, acesso TUP11 (Tupanciretã); C) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta); D – F: polens corados com orcéina acética 2%. D) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); E) pólen viável e inviável (diminuto – seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); F) polens viáveis, acesso SM05 (Santa Maria); G – I: polens corados com carmim acético 2%. G) pólen inviável, acesso SM06 (Santa Maria); H) polens viáveis e pólen inviável (seta), acesso ERE01 (Erechim); I) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta). Escala de 10µm. 63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1 – Células em interfase, mitose e índice mitótico de células de radículas de *Allium cepa* L. tratadas com extratos aquosos de inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl 37
- Tabela 2 – Alterações cromossômicas em células de radículas de *Allium cepa* L. tratadas com extratos aquosos de inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl. 38
- Tabela 3 – Compostos fenólicos (mg.g^{-1}) de extratos aquosos das inflorescências de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl. na concentração de 12 g.L^{-1} em Santa Maria, RS (acesso 1) e Erechim, RS (acesso 2). $\text{CV}\% = 0,68$ 40
- Tabela 4 – Compostos fenólicos (mg.g^{-1}) de extratos aquosos das folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl. na concentração de 12 g.L^{-1} em Santa Maria, RS (acesso 1) e Erechim, RS (acesso 2). $\text{CV}\% = 0,40$ 40

ARTIGO 2

- Tabela 1 – Acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl., locais de coleta, número de registro no Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB) e tipo de análise realizada com cada acesso (comportamento meiótico/viabilidade polínica)..... 58
- Tabela 2 – Comportamento meiótico, índice meiótico (IM) e porcentagem de células anormais em 12 acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl 59
- Tabela 3 – Porcentagem de polens viáveis e estimativa da viabilidade polínica (%) de 14 acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltldl. através de três diferentes corantes..62

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Aspecto de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl. do município de Santa Maria, RS.	73
Anexo B – Aspecto de folhas e inflorescências de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl. do município de Santa Maria, RS.....	73
Anexo C – Aspecto de inflorescências com flores de estames de filetes curtos (pistiladas – seta A) e longos (estaminadas – seta B) de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl. do município de Santa Maria, RS.	74
Anexo D – Desenho esquemático de flores (vista frontal) A) estaminadas e B) pistiladas de <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl.	74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA, ANTIGENOTÓXICA E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Sambucus australis</i> CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)	17
Resumo	18
Introdução	19
Material e Métodos	21
Coleta das plantas.....	21
Preparo dos extratos aquosos.....	21
Sistema teste <i>in vivo</i> de <i>Allium cepa</i> L.....	22
Efeitos dos extratos aquosos sobre o ciclo celular de <i>Allium cepa</i>	23
Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
Análise estatística	25
Resultados e Discussão	25
Agradecimentos	32
Abstract	32
Referências	33
ARTIGO 2: COMPORTAMENTO MEIÓTICO E ESTIMATIVA DA VIABILIDADE POLÍNICA DE ACESSOS DE <i>Sambucus australis</i> CHAM. & SCHLTDL. (ADOXACEAE)	42
Resumo	42
Abstract	43
Introdução	43
Material e Métodos	46
Resultados e Discussão	48
Análise meiótica	48
Viabilidade polínica	51
Conclusões	54
Referências	54
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	73

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as plantas medicinais, por ser de domínio público, representou e ainda representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Essa prática, caracterizada pela utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, é tão antiga quanto a espécie humana (DI STASI, 1996).

As espécies medicinais nativas do Brasil possuem um enorme potencial econômico e, por isso, são consideradas uma riqueza a ser preservada e utilizada, tornando-se necessário conservar a diversidade genética vegetal disponível. Assim, estudos de caracterização de germoplasma de uma espécie são indispensáveis para potencializar a utilização dos recursos medicinais nativos de um país e também para possibilitar que essas espécies sejam incluídas em um programa de melhoramento genético (PEREIRA, 2006).

No Rio Grande do Sul, muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular. Dentre essas, destaca-se *Sambucus australis* Cham. & Schltdl., popularmente conhecida como sabugueiro, sabugueiro-do-rio-grande e sabugueiro-do-brasil (NUNES et al., 2007). O gênero *Sambucus* L., no qual se encontra *S. australis*, pertencida à família Caprifoliaceae (CRONQUIST, 1981); porém, estudos recentes incluíram *Sambucus*, juntamente com outro gênero desta família (*Viburnum* L.), na família Adoxaceae (APG II, 2003).

Sambucus australis é uma planta nativa do Brasil, ocorrendo da Região Sudeste até o Rio Grande do Sul e no Paraguai, Argentina e Uruguai (BACIGALUPO, 1974; REITZ, 1985). Trata-se de uma espécie de porte médio a grande, com 3 a 4 metros de altura, de copa irregular e bastante ramificada, com tronco tortuoso e casca fissurada. As folhas são compostas imparipinadas, com 7 (raro 5) a 13 folíolos membranáceos, de superfície brilhante, com nervuras salientes, que exalam odor desagradável quando amassadas. As flores são pequenas, de cor branca, odoríferas, reunidas em inflorescências corimbosas terminais. O androceu é formado por cinco estames epipétalos, que podem apresentar filetes curtos (flores pistiladas) ou longos (flores estaminadas). O gineceu é formado por cinco carpelos soldados entre si, com cinco lóculos e cinco rudimentos seminiais. Os frutos são drupas globosas, de cor roxo-escura quando maduros, contendo de 3 a 5 sementes (BACIGALUPO, 1974; REITZ, 1985; NUNES et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008).

Na medicina alternativa, quando preparada na forma de tintura, essa planta é usada como agente diaforético, carminativo e diurético (JORGE et al., 1999). Infusões preparadas com as cascas ou as folhas são indicadas para casos de inflamação, reumatismo, queimadura e

dor (JORGE et al., 1999; GUARRERA et al., 2005). Suas flores são utilizadas sob a forma de infusão ou decocção, como diuréticas, antipiréticas, anti-inflamatórias, laxativo leve e no tratamento de doenças do aparelho respiratório, sarampo e catapora (CRUZ, 1979; REITZ, 1985; LORENZI; MATOS, 2008). As flores são também utilizadas externamente contra irritação dos olhos, dermatoses, queimaduras leves, úlceras bucais e pequenas injúrias (LORENZI; MATOS, 2008).

Devido a grande utilização das plantas medicinais, o conhecimento das mesmas, desde os níveis celulares, bem como a ação sobre os organismos vivos, torna-se imprescindível (FRESCURA, 2012). Dentre os estudos importantes que podem ser realizados com espécies medicinais, destacam-se os de caracterização citogenética, os quais auxiliam na resolução de problemas taxonômicos, minimizando as dificuldades na sua identificação correta; no fornecimento de dados importantes para a compreensão da evolução das espécies; na 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); e, na informação de possíveis alterações cromossômicas causadas pelas plantas devido à presença de substâncias mutagênicas na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo (BAGATINI et al., 2007).

Um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citogenética é a análise do comportamento dos cromossomos durante a meiose, através do qual é possível determinar o nível de fertilidade e número haplóide do indivíduo. A viabilidade do pólen também é uma característica muito importante, pois evidencia o potencial do gameta masculino da espécie, contribuindo em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos (ARROYO, 1981; GUINET, 1989). O conhecimento desses atributos é fundamental para a escolha de estratégias destinadas à conservação e exploração das espécies em seu habitat natural, com a perspectiva de preservação da diversidade e garantia da sustentabilidade (OYAMA, 1993).

Diversos estudos já foram realizados com espécies medicinais nativas objetivando a análise da meiose e viabilidade polínica. Estudando a espécie *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle (carqueja), Auler et al. (2006) encontraram porcentagem de células normais, índice meiótico e viabilidade do pólen acima de 85%, sugerindo que essa espécie pode ser introduzida em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes. Para a espécie *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., foi encontrado número haplóide $n = 14$ e os valores do índice meiótico e estimativa da viabilidade polínica apresentaram-se altos, de 71,19 a 92,34% e 83,25 a 96%, respectivamente (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). Ainda, Olkoski et al. (2008) realizaram a caracterização citogenética de *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron.,

Pterocaulon polystachyum DC. e *Solidago microglossa* DC., determinando que a meiose foi regular em todos os acessos, com $n = 10$ para *A. squamatus* e $n = 9$ para *P. polystachyum* e *S. microglossa*, o índice meiótico variou de 65 a 92% e a viabilidade polínica foi superior a 97%. No entanto, esses estudos são escassos para *S. australis*.

Segundo Lorenzi e Matos (2002), é de conhecimento geral que, no Brasil, as formas usuais de preparação de plantas medicinais são os chás ou infusões (extratos aquosos). No entanto, o uso indiscriminado e descontrolado dessas plantas pode ser mais prejudicial à saúde da população do que benéfico (FRESCURA, 2012). Além disso, estudos recentes mostraram que os extratos vegetais têm um grande potencial para serem utilizados na medicina como substâncias capazes de prevenir ou amenizar danos causados ao organismo humano (CORDELL, 1995). Assim, a avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico das plantas medicinais se faz necessária para ampliar a segurança do uso dessas plantas pela população (STURBELLE et al., 2010). Esse potencial pode ser monitorado através da utilização do sistema teste de *Allium cepa* L. (cebola) (BAGATINI et al., 2007), o qual é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um ensaio eficaz para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (SILVA et al., 2004).

Por ser um método rápido e barato, o teste de *A. cepa* é um dos mais utilizados para detecção de genotoxicidade. Além disso, este teste permite avaliar danos nos cromossomos e distúrbios no ciclo mitótico, pois o organismo utilizado (cebola) apresenta cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (FISKESJÖ, 1985), além de demonstrar uma alta sensibilidade na detecção de agentes clastogênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Ainda, o sistema teste vegetal de *A. cepa* é validado por pesquisadores que realizaram de forma conjunta testes animais *in vitro*, utilizando células de medula óssea de ratos e/ou linfócitos humanos e os resultados foram similares (CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; PINHO et al., 2010).

Os efeitos dos extratos aquosos de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *A. cepa* têm sido reportados por vários autores, como por exemplo: Knoll et al. (2006), estudando a espécie *Pterocaulon polystachyum* DC.; Bagatini et al. (2009), analisando a espécie *Solidago microglossa* DC.; Souza et al. (2010), examinando a espécie *Artemisia verlotorum* Lam.; Neves et al. (2014), pesquisando a espécie *Phyllanthus niruri* L.; e, Kuhn et al. (2015) estudando a espécie *Eugenia uniflora* L. Esses autores demonstraram que os principais efeitos que ocorrem são genotoxicidade e antigenotoxicidade, bem como, diminuição da divisão celular (efeito antiproliferativo).

Para complementar o estudo dos extratos de plantas medicinais, é necessário se ter o conhecimento sobre quais compostos estão presentes nos mesmos. Dentre as classes de compostos com maior representação no reino vegetal encontram-se os compostos fenólicos, os quais formam um grupo quimicamente heterogêneo. São conhecidos dois grandes grupos desses compostos na natureza: os ácidos fenólicos e os flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é possível se obter representatividade dos compostos fenólicos presentes em extratos vegetais e, dessa forma, estabelecer um parâmetro comparativo para reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise (ALAERTS et al., 2007).

Por meio dessa técnica, Scopel (2005) observou a formação de quatro grupos de compostos em extratos hidroetanólicos de inflorescências de *S. australis*: 1) ácidos fenólicos, 2) glicosídeos de flavonoides (sem possíveis indicações); 3) glicosídeos de flavonoides (possivelmente hiperosídeo, isoquercitrina e derivado de canferol); e, 4) flavonoides aglicolisados (quercitina e canferol). A principal atividade farmacológica atribuída a esses compostos é o efeito antioxidante (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; DORNAS et al., 2007).

Devido ao exposto e também à escassez de trabalhos que informem sobre a caracterização citogenética e genotoxicidade/antigenotoxicidade de *S. australis*, indica-se a necessidade de pesquisas que promovam o conhecimento científico da espécie.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica de extratos aquosos de inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis* através do sistema teste de *A. cepa*, bem como determinar os compostos fenólicos presentes nesses extratos (Artigo 1), além de analisar o comportamento meiótico e estimar a viabilidade polínica através de distintos métodos de coloração de diferentes acessos de *S. australis* (Artigo 2).

ARTIGO 1¹

Atividade antiproliferativa, antígeno-tóxica e compostos fenólicos de extratos aquosos de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. (ADOXACEAE)

Marília Tedesco¹, Andrielle Wouters Kuhn¹, Viviane Dal-Souto Frescura², Aline Augusti Boligon³, Margareth Linde Athayde³, Solange Bosio Tedesco⁴, Antonio Carlos Ferreira da Silva⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil.

² Coordenação Acadêmica, Universidade Federal de Santa Maria, campus Cachoeira do Sul, Av. Presidente Vargas, 1958, Bairro Santo Antônio, Cachoeira do Sul, RS, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil.

Palavras-chave: plantas medicinais, índice mitótico, *Allium cepa* L., sabugueiro, cromatografia líquida de alta eficiência.

Ação e compostos fenólicos de *Sambucus australis*

Seção da Academia Brasileira de Ciências: Ciências Biológicas

Autor para correspondência: Marília Tedesco, Avenida Roraima, nº 1000, Prédio 16, Sala 3118 - Campus Camobi, CEP: 97105900 - Santa Maria, RS – Brasil, Telefone: (55) 2208339/Ramal:216, e-mail: marilia_tedesco@hotmail.com

¹ Este artigo foi elaborado conforme normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a atividade antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica dos extratos aquosos de dois acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L., bem como determinar os compostos fenólicos presentes nesses extratos. Inflorescências e folhas de *S. australis* foram empregadas para o preparo dos extratos aquosos em duas concentrações: 3 g.L⁻¹ e 12 g.L⁻¹. Os bulbos de *A. cepa* foram enraizados em água destilada e, posteriormente, transferidos para os tratamentos por 24 horas. As radículas foram coletadas, fixadas em Carnoy por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das pontas de raízes, coradas em orceína acética 2% e então analisadas. Os compostos fenólicos foram determinados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Observou-se que os extratos aquosos de inflorescências e folhas de *S. australis* apresentam potencial antiproliferativo e os extratos das folhas de *S. australis* (12g.L⁻¹), nos dois acessos, possuem atividade antigenotóxica. Pela análise dos compostos fenólicos foi possível determinar a presença de flavonóides e ácidos fenólicos, sendo o canferol e o ácido clorogênico os compostos majoritários nos extratos das inflorescências e folhas, respectivamente.

Palavras-chave: plantas medicinais, índice mitótico, *Allium cepa*, sabugueiro, cromatografia líquida de alta eficiência.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pelo Homem para o alívio de sintomas ou combate a doenças data de cerca de cinco mil anos em documentos escritos por antigas civilizações e, ainda hoje, em várias partes do mundo, as plantas são a única fonte de acesso para tratamento de doenças (Hamburger e Hostettmann 1991). No Brasil, o emprego dessas plantas teve origem na prática indígena que, em conjunto a outras práticas trazidas por escravos africanos e colonizadores portugueses, resultaram em uma rica cultura popular (Nogueira 1983).

Dentre as plantas com elevado potencial medicinal, encontra-se *Sambucus australis* Cham. & Schldl., pertencente à família Adoxaceae. O sabugueiro, como é popularmente conhecido, é um arbusto grande ou arvoreta de 3 a 4 m de altura, de copa irregular, com tronco tortuoso e casca fissurada. As folhas são compostas imparipinadas, com folíolos membráceos e as flores, pequenas, de cor branca, odoríferas e reunidas em inflorescências corimbosas terminais (Lorenzi e Matos 2008). *Sambucus australis* é uma espécie nativa do Brasil, ocorrendo da Região Sudeste até o Rio Grande do Sul e também no Paraguai, Argentina e Uruguai (Bacigalupo 1974, Reitz 1985). Na forma de tintura, a planta é usada como agente diaforético, carminativo e diurético. Infusões preparadas com as cascas ou as folhas são indicadas para casos de inflamação, reumatismo, queimadura e dor (Jorge et al. 1999, Guarrera et al. 2005). As flores são utilizadas sob a forma de infusão, como diuréticas, antipiréticas, anti-inflamatórias, laxativo leve, no tratamento de doenças do aparelho respiratório, sarampo e catapora (Cruz 1979, Reitz 1985, Lorenzi e Matos 2008).

Apesar da sua grande utilização, *S. australis*, assim como grande parte das plantas medicinais, não foi suficientemente estudada, principalmente no que se refere ao seu potencial genotóxico. Ademais, estudos recentes mostraram que os extratos vegetais têm um grande potencial para serem utilizados na medicina como substâncias capazes de prevenir ou amenizar danos causados ao organismo humano (Cordell 1995). Assim, a avaliação do potencial genotóxico e

antigenotóxico das plantas medicinais, que pode ser conduzida por meio do teste de *Allium cepa* (cebola), se faz necessária para ampliar a segurança do uso dessas plantas pela população (Sturbelle et al. 2010).

O sistema teste de *A. cepa* é considerado eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais, sendo validado pelo Programa Internacional de Segurança Química/IPCS - OMS, e o Programa Ambiental das Nações Unidas/UNEP (Silva et al., 2004). Trata-se de um método rápido e barato que permite avaliar danos nos cromossomos e distúrbios no ciclo mitótico, pois a cebola apresenta cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (Fiskesjö 1985), além de elevada sensibilidade na detecção de agentes clastogênicos (Leme e Marin-Morales 2008). Além disso, o teste é corroborado por vários pesquisadores que o realizaram de forma conjunta com testes animais *in vitro*, utilizando células de medula óssea de ratos e/ou linfócitos humanos e os resultados foram similares (Camparoto et al. 2002, Teixeira et al. 2003, Pinho et al. 2010).

Os efeitos genotóxicos induzidos por espécies vegetais decorrem, principalmente, em consequência da presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu próprio metabolismo secundário (Bagatini et al. 2007). Segundo Kutchan (2001), a síntese de metabólitos secundários é influenciada pelas condições ambientais, já que os mesmos representam uma interface química das plantas com o ambiente ao seu redor. Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são: a sazonalidade, a temperatura, a disponibilidade hídrica, o índice pluviométrico, a altitude e a variabilidade genética, entre outros (Gobbo-Neto e Lopes 2007, Frescura et al. 2012).

Dentre as classes de metabólitos secundários com maior representação no reino vegetal encontram-se os compostos fenólicos, os quais formam um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente dez mil compostos. São conhecidos dois grandes grupos desses compostos na natureza: os ácidos fenólicos e os flavonoides (Taiz e Zeiger, 2013). Através da utilização de perfis cromatográficos ou *fingerprints* é possível obter representatividade dos compostos fenólicos

presentes em extratos vegetais e, dessa forma, estabelecer um parâmetro comparativo para reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise (Alaerts et al. 2007).

Assim, no presente estudo, objetivou-se avaliar a atividade antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica de extratos aquosos de inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis* através do sistema teste *in vivo* de *A.cepa*, bem como determinar os compostos fenólicos presentes nos extratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DAS PLANTAS

As inflorescências e as folhas de dois acessos de *S. australis* foram coletadas nos municípios de Santa Maria (SM), RS, Brasil (Acesso 1 – 29°40'41.2"S e 53°47'21.6"W) e Erechim, RS, Brasil (Acesso 2 – 27°43'13"S e 52°18'43"W). A escolha dos municípios de Santa Maria e Erechim foi baseada na grande diferença de altitude entre os mesmos (113m e 783m, respectivamente). As folhas e inflorescências foram armazenadas à temperatura ambiente (25°C) durante um período de 60 dias para posteriormente serem utilizadas no preparo dos extratos aquosos. De cada acesso, colocou-se uma amostra testemunha no herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB), da UFSM, sob número de registro 15.421 (Acesso 1) e 15.425 (Acesso 2). As plantas foram identificadas pela Profa Dra Thais Scotti do Canto-Dorow.

PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. Para o preparo dos extratos aquosos, folhas e inflorescências secas de cada acesso foram colocadas em um béquer (1L) com água fervente (100°C), permanecendo em infusão por 10 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados e resfriados à temperatura ambiente. Os extratos aquosos foram

preparados em duas concentrações: 3 g.L⁻¹ e 12 g.L⁻¹. As concentrações foram escolhidas levando-se em consideração a quantia de 3 g.L⁻¹ indicada pela regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa 2010) para a espécie *S. australis*, bem como uma dose quatro vezes maior que a indicada (12 g.L⁻¹).

SISTEMA TESTE *in vivo* DE *Allium cepa*

Para avaliar a atividade genotóxica e antigenotóxica dos extratos aquosos de *S. australis*, foram utilizados 15 grupos de quatro bulbos de *Allium cepa*, cada grupo correspondendo a um dos tratamentos. Os grupos de bulbos foram colocados para enraizar em água destilada e, após a emergência das radículas, cada grupo foi transferido para o seu respectivo tratamento. O primeiro grupo (T1) foi usado como controle negativo e mantido em água destilada, e os grupos restantes foram transferidos para os seguintes tratamentos: T2 – extrato aquoso das inflorescências 3 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T3 – extrato aquoso das folhas 3 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T4 – extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T5 – extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T6 – extrato aquoso das inflorescências 3 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim); T7 – extrato aquoso das folhas 3 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim); T8 – extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim); T9 – extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim); T10 – glifosato 1% (controle positivo); T11 – glifosato 1% + 24 horas em água; T12 – glifosato 1% + 24 horas no extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T13 – glifosato 1% + 24 horas no extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 1 – SM); T14 – glifosato 1% + 24 horas no extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim); T15 – glifosato 1% + 24 horas no extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 2 – Erechim). Após permanecerem em contato com os tratamentos por 24 horas, as radículas foram coletadas, fixadas em etanol:ácido acético (3:1) durante 24 horas e mantidas em álcool 70% sob refrigeração até o preparo das lâminas.

O glifosato (herbicida não seletivo) foi utilizado como controle positivo, pois já demonstrou induzir alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* (Souza et al. 2010, Frescura et al. 2012).

Para verificação de possível atividade antigenotóxica, os grupos de bulbos previamente submetidos ao glifosato 1% por 24 horas foram colocados em contato com a água destilada e os extratos aquosos nas maiores concentrações de *S. australis* por mais 24 horas (T11, T12, T13, T14 e T15), para observação da minimização dos danos cromossômicos acarretados pelo glifosato.

EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS SOBRE O CICLO CELULAR DE *Allium cepa*

Para o preparo das lâminas, radículas de *A. cepa* de aproximadamente 2 cm foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos e lavadas em água destilada. A região meristemática de cada radícula foi corada comorceína acética 2%, esmagada com auxílio de um pequeno bastão de vidro, e sobre o material, colocada uma lamínula (Guerra e Souza 2002). Foram confeccionadas duas lâminas por repetição (bulbo), sendo contadas 1000 células por bulbo, representando 4000 células para cada um dos tratamentos e totalizando 60000 células analisadas no experimento. As lâminas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico LEICA com aumento de 400X, observando-se as células em interfase e divisão celular (mitose) para calcular o Índice Mitótico (IM), bem como a ocorrência de alterações cromossômicas, como presença de pontes em anáfase e telófase, cromossomos perdidos, micronúcleos e células binucleadas (Tedesco e Laughinghouse 2012).

O índice mitótico (IM) foi obtido dividindo-se o número de células em divisão pelo número total de células observadas, multiplicado por 100.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada para a determinação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas e das inflorescências de *S. australis*. A análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais

Todos os reagentes químicos foram de grau analítico. Acetonitrila, ácido fórmico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido elágico foram adquiridos da Merck (Darmstadt,

Alemanha). Quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT, conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, detector de arranjos de diodo SPD-M20A e software LC solution 1.22 SP1.

Quantificação dos compostos através 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 5µm. A fase móvel utilizada foi água contendo 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de composição foi: 13% de B durante 10 min e modificado até obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% e 10% B em 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Kamdem et al. (2013), com pequenas modificações. Os extratos aquosos das folhas e inflorescências (Acesso 1 e 2) de *S. australis*, além da fase móvel, foram filtrados através de um filtro de membrana de 0.45 µm (Millipore) e desgaseificados por banho de ultrassom antes do uso. As amostras de *S. australis* foram analisadas na concentração de 12 g.L⁻¹. O fluxo usado foi de 0,6 mL.min⁻¹, o volume de injeção de 50 µL e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 325 nm para o ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido elágico, e 365 nm para quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (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 0.025 – 0.300 mg.mL⁻¹ para quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol; e 0.050 – 0.450 mg.mL⁻¹ para ácido gálico, ácido clorogênico 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: $Y = 13174x + 1273.6$ ($r = 0.9997$); ácido clorogênico: $Y = 12764x + 1197.4$ ($r = 0.9998$); ácido

cafeico: $Y = 11992x + 1367.1$ ($r = 0.9999$); ácido elágico: $Y = 13286x + 1264.1$ ($r = 0.9997$); quercitrina: $Y = 12837x + 1364.5$ ($r = 0.9999$); isoquercitrina: $Y = 12769x + 1326.5$ ($r = 0.9996$); rutina: $Y = 13158x + 1173.9$ ($r = 0.9998$); quercitina: $Y = 13627x + 1292.5$ ($r = 0.9996$) e canferol: $Y = 13271x + 1324.6$ ($r = 0.9999$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a 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 σ é o desvio padrão da resposta, e S é a inclinação da curva de calibração (Boligon et al. 2013).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados referentes ao teste de *A. cepa* e à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foram comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro através do programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (Silva e Azevedo 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os efeitos dos extratos aquosos de *S. australis* foram avaliados através do sistema teste vegetal de *A. cepa*. A Tabela 1 mostra o número de células em interfase, o número de células em mitose e o índice mitótico (IM) de radículas de *A. cepa* tratadas com os diferentes extratos aquosos e controles de dois acessos de *S. australis*.

Todos os tratamentos testados diferiram estatisticamente do controle negativo (T1), proporcionando uma redução significativa da divisão celular de *A. cepa*. A comparação do índice mitótico dos extratos aquosos das inflorescências de *S. australis* dos dois acessos na concentração de 3 g.L^{-1} mostrou que o T2 (acesso 1) diferiu significativamente do T6 (acesso 2), e o T6 causou uma maior redução no índice mitótico que o T2. No entanto, quando os extratos aquosos das

inflorescências de *S. australis* dos dois acessos na concentração de 12 g.L⁻¹ foram comparados, o T4 (acesso 1) não diferiu significativamente do T8 (acesso 2).

De forma semelhante ao que ocorreu com os extratos das inflorescências, a comparação do índice mitótico dos extratos aquosos das folhas de *S. australis* dos dois acessos na concentração de 3 g.L⁻¹ mostrou que o T3 (acesso 1) diferiu significativamente do T7 (acesso 2), e o T7 causou uma maior redução no índice mitótico que o T3. No entanto, quando os extratos aquosos das folhas de *S. australis* dos dois acessos na concentração de 12 g.L⁻¹ foram comparados, o T5 (acesso 1) não diferiu significativamente do T9 (acesso 2).

(Tabela 1)

Comparando-se os valores dos IM nas duas concentrações dos extratos aquosos das inflorescências de *S. australis* no acesso 1, o T2 e o T4 diferiram significativamente entre si, sendo que o extrato na maior concentração (T4) provocou a maior redução no IM. Ainda comparando os valores dos IM no acesso 1, porém entre as duas concentrações dos extratos aquosos das folhas, o T3 diferiu significativamente do T5, com a maior concentração do extrato também provocando a maior redução do IM.

Já no acesso 2, os extratos aquosos das inflorescências, nas duas concentrações (T6 e T8), não diferiram significativamente entre si. Entretanto, quando se comparou os extratos aquosos das folhas nas duas concentrações (T7 e T9), houve diferença significativa entre os mesmos, sendo que a maior concentração do extrato (T9) acarretou uma maior redução do IM.

A avaliação do efeito dos extratos aquosos de *S. australis* pelo teste de *A. cepa* demonstrou que houve uma significativa inibição da divisão celular em todas as concentrações analisadas nos dois acessos, levando a uma diminuição dos valores dos índices mitóticos, o que indica a atividade antiproliferativa dos extratos aquosos da espécie. Além disso, os extratos na maior concentração (12 g.L⁻¹) apresentaram uma inibição do IM maior do que aquela observada nos extratos de menor concentração (3 g.L⁻¹), tanto para as folhas quanto para as inflorescências, nos dois acessos

analisados. Entre os acessos analisados, não houve diferença significativa na atividade antiproliferativa.

Outros autores também verificaram a atividade antiproliferativa de extratos aquosos de diferentes espécies utilizando o sistema teste de *A. cepa*. Estudando a espécie *Luehea divaricata* Mart., Frescura et al. (2012) observaram que os extratos aquosos das folhas (6 e 30 g.L⁻¹) e cascas do caule (32 e 160 g.L⁻¹) de duas populações dessa planta provocaram uma diminuição nos valores dos índices mitóticos de *A. cepa*. Ainda, semelhantemente ao que ocorreu com os extratos aquosos de *S. australis*, essa diminuição nos valores dos IM foi mais acentuada à medida que se aumentava a concentração dos extratos.

Knoll et al. (2006) relataram o efeito antiproliferativo dos extratos aquosos de folhas de seis populações de *Pterocaulon polystachyum* DC. nas concentrações de 2,5 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹, assim como Fachinetto et al. (2007) ao estudarem o efeito dos extratos aquosos de *Achyrocline satureioides* DC. nas concentrações de 5 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹. Nesses dois estudos, assim como no presente trabalho, as concentrações mais elevadas dos extratos aquosos apresentaram uma inibição do IM mais acentuada do que as menores concentrações e o controle negativo.

Avaliando o efeito de infusões das folhas de *Solidago microglossa* DC. sobre o ciclo celular de *A. cepa*, Bagatini et al. (2009) observaram que a maior concentração testada (14 mg.mL⁻¹) provocou uma redução no índice mitótico, demonstrando, assim, o efeito antiproliferativo dessa espécie.

A alta concentração de alguns compostos pode promover um efeito (inibitório ou estimulante) no ciclo celular (Fachinetto et al. 2007). Os extratos aquosos de folhas e inflorescências de *S. australis* possuem flavonoides, como a rutina, o canferol, a quercetina e a quercitrina (Tabelas 3 e 4), os quais constituem uma importante classe de compostos fenólicos, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (Zuanazzi 2001). A atividade antiproliferativa dos extratos aquosos avaliados neste trabalho pode ser conferida aos flavonoides encontrados na espécie *S. australis*, já que são atribuídos a esses compostos diferentes

efeitos farmacológicos, entre eles, a ação antiproliferativa e a ação anticarcinogênica (Hollman et al. 1996, Pelzer et al. 1998).

Em um trabalho realizado por Scopel (2005), foi verificado que os extratos aquosos e hidroetanólicos de inflorescências de *S. australis* possuem um efeito antioxidante acentuado, o que também pode explicar a inibição da divisão celular de *A. cepa* provocada pelos extratos aquosos das folhas e inflorescências de *S. australis* no presente trabalho.

Na Tabela 2, são apresentados o número de células com alterações cromossômicas e os tipos de alterações que ocorreram em cada um dos tratamentos. A análise das células em interfase e em divisão celular, pelo teste de *A. cepa*, mostrou a presença de irregularidades cromossômicas dos tipos: pontes em anáfase (Figura 1A e 1B) e telófase (Figura 1C), cromossomos perdidos (Figura 1D), quebras (Figura 1E) e micronúcleos (Figura 1F).

(Tabela 2)

(Figura 1)

Houve diferença significativa na comparação dos valores de alterações cromossômicas entre o controle negativo (T1), sem alterações, e o controle positivo (T10), com 50 alterações (Tabela 2). O controle positivo (T10) também diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos. Entretanto, os tratamentos T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9 não diferiram significativamente do controle negativo (T1), nem entre si. Ainda, numericamente, os valores das alterações cromossômicas desses tratamentos foram muito reduzidos, atingindo, no máximo, 0,5. Por essa razão, verificou-se que os extratos aquosos preparados a partir das inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis* não apresentaram efeito genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*.

Ao contrário do encontrado neste trabalho, alguns extratos aquosos de plantas medicinais apresentaram efeito genotóxico, como as espécies *Baccharis trimera* (Less.) DC. e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd., estudadas por Fachinetto e Tedesco (2009), Nora et al. (2010) e Dias et al. (2014), respectivamente.

Neste estudo, também foi avaliado o efeito antígenotóxico dos extratos aquosos de *S. australis*. Para tanto, as alterações cromossômicas observadas no controle positivo (T10) e no controle negativo (T1) foram analisadas, e este valor foi comparado com os valores das alterações observadas nos tratamentos T11, T12, T13, T14 e T15 (Tabela 2), onde os bulbos de *A. cepa* foram tratados, primeiramente, por 24 horas em contato com glifosato 1% e, posteriormente, por água destilada em T11, extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 1) em T12, extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 1) em T13, extrato aquoso das inflorescências 12 g.L⁻¹ (acesso 2) em T14 e extrato aquoso das folhas 12 g.L⁻¹ (acesso 2) em T15 por mais 24 horas. O T11 foi utilizado para realização da recuperação das raízes de *A. cepa* em água destilada, onde se esperava que as células tivessem o tempo necessário para que a divisão celular ocorresse sem apresentar danos cromossômicos causados pelo glifosato 1% (Peron et al. 2009).

Os tratamentos T11 (17 alterações), T12 (27 alterações), T13 (11 alterações), T14 (21 alterações) e T15 (10 alterações) diferiram significativamente do controle negativo (T1 – 0 alterações). Os tratamentos citados anteriormente (Tabela 2) também diferiram significativamente do controle positivo (T10 – 50 alterações). Os tratamentos T12 e T14 não diferiram significativamente do T11.

Os resultados obtidos nos tratamentos T13 (glifosato + 24h folhas 12 g.L⁻¹, acesso 1) e T15 (glifosato + 24h folhas 12 g.L⁻¹, acesso 2) mostraram que houve uma redução significativa no número de alterações cromossômicas, com médias de 2,7 e 2,5, respectivamente, comparados com o T10 (glifosato, controle positivo) e o T11 (glifosato + 24h água destilada), com médias de 12,5 e 4,25, respectivamente, indicando que os extratos aquosos das folhas de *S. australis* na concentração de 12 g.L⁻¹, em ambos acessos de Santa Maria e Erechim, apresentaram potencial antígenotóxico sobre o ciclo celular de *A. cepa*.

Em um estudo conduzido por Sturbelle et al. (2010), foram testadas soluções de *Aloe vera* (L.) Burm. f. para determinar o nível de antimutagenicidade dessa planta através do teste de *A. cepa*. Nesse caso, uma solução de paracetamol a 800mg/L foi utilizada como agente indutor de

mutações cromossômicas, onde as raízes de *A. cepa* permaneceram por 24 horas. Semelhantemente ao que ocorreu com os extratos das folhas de *S. australis*, observou-se que as soluções de *Aloe vera* apresentaram atividade antimutagênica quando colocadas 24 h após a solução de paracetamol.

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os compostos fenólicos que foram identificados a partir da análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos de inflorescências e folhas, respectivamente, de *S. australis* na concentração de 12 g.L⁻¹. Essa análise permitiu a identificação dos seguintes compostos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol. Todos os compostos relatados foram encontrados tanto nos extratos aquosos das inflorescências de *S. australis*, quanto nos extratos das folhas.

(Tabela 3)

(Tabela 4)

Analisando extratos das inflorescências de *S. australis*, Alice et al. (1990) identificaram a presença de flavonoides do tipo 3-O-monoglicosídeo de diidroflavonol, 3,7-O-diglicosídeo de flavonol, isoquercitrina, rutina e quercetina, assim como ácidos cafeico e clorogênico. Ainda, em *screening* realizado com as inflorescências de *S. australis*, foi possível observar a presença de grande quantidade de flavonoides, bem como esteróis e triterpenos em menor quantidade (Alice et al. 1991).

Pavanelo (2014) realizou análise por CLAE para determinar a composição fitoquímica de extratos aquosos de folhas e frutos de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud., onde foram identificados os mesmos compostos encontrados em *S. australis*, como ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido elágico, canferol, isoquercitrina, quercetina, quercitrina e rutina, além de ácido rosmarínico, catequina e epicatequina.

A investigação dos perfis cromatográficos da CLAE levou a observação de que o canferol (majoritário) e os ácidos elágico e clorogênico foram os compostos encontrados em maior quantidade nos extratos aquosos das inflorescências de *S. australis*. Já nos extratos aquosos das

folhas, os compostos predominantes foram os ácidos clorogênico (majoritário), cafeico e elágico (Figura 2). A principal atividade farmacológica atribuída a esses compostos é o efeito antioxidante (Bianchi e Antunes 1999, Soares 2002, Dornas et al. 2007), pois os mesmos atuam como sequestradores de radicais livres (Shahidi et al. 1992).

(Figura 2)

A partir da análise dos compostos fenólicos pode-se observar que houve diferença significativa entre as médias dos acessos 1 e 2 para a maioria dos compostos estudados, exceto quercetina nos extratos das inflorescências. No entanto, quando comparados entre si, esses acessos não mostraram diferença significativa para os valores dos índices mitóticos das células de *A. cepa* submetidas aos extratos aquosos das inflorescências e das folhas de *S. australis* (Tabela 1). Apesar dos acessos serem de locais com grande diferença de altitude e existir uma correlação positiva entre o conteúdo total de flavonoides e a altitude (Gobbo-Neto e Lopes 2007) e, ainda, os compostos terem variado em quantidades de um acesso para outro, a inibição da divisão celular não foi influenciada pela diferença encontrada nesses compostos. Assim, a atividade antiproliferativa promovida pelos extratos de *S. australis* pode ser proveniente da interação entre os compostos fenólicos (sinergismo), e não da ação de algum(ns) composto(s) isoladamente (Martins 2000).

Cechinel Filho e Yunes (1998) demonstraram que diferentes extratos de *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg. exercem potentes efeitos analgésicos quando analisados em modelos experimentais de dor em camundongos. Nesse estudo, vários compostos ativos foram isolados e testados positivamente quanto ao seu efeito analgésico, podendo também esse efeito ser resultado do sinergismo entre os compostos, como o observado no presente trabalho.

Verifica-se nesse experimento que, em células de *A. cepa*, os extratos aquosos das inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis* apresentam potencial antiproliferativo e não genotóxico. Além disso, os extratos preparados a partir das folhas de *S. australis* na concentração de 12g.L^{-1} nos dois acessos demonstram possuir atividade antigenotóxica, diminuindo os danos causados pelo glifosato. Ainda, a partir da análise dos extratos por cromatografia líquida de alta

eficiência, foi possível determinar os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol, sendo o canferol e o ácido clorogênico os compostos majoritários nos extratos das inflorescências e folhas, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CAPES) pelo apoio financeiro e à professora Thais Scotti do Canto-Dorow pela identificação da espécie.

ABSTRACT: Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phenolic compounds of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (ADOXACEAE)

The purpose of this study was to evaluate the antiproliferative, genotoxic and antigenotoxic activity of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. aqueous extracts on the cell cycle of *Allium cepa* L. as well as determine the phenolic compounds in such extracts. *S. australis* inflorescences and leaves of two accessions were used for aqueous extract preparation at concentrations: 3 g.L⁻¹ and 12 g.L⁻¹. *A. cepa* bulbs were rooted in distilled water and, subsequently, placed in treatments for 24 hours. Rootlets were collected and fixed in Carnoy's solution for 24 hours and kept in alcohol 70%. The squash technique was performed for slide preparation. Root tips were smashed, stained with 2% acetic orcein and analyzed. The phenolic compounds were determined using high-performance liquid chromatography and data was analyzed using the Scott-Knott test. The results show that *S. australis* aqueous extracts of inflorescences and leaves have antiproliferative potential and the extracts from *S. australis* leaves of both accessions at a concentration of 12g.L⁻¹ have shown antigenotoxic activity. The phenolic compounds analysis allowed us to determine the presence of

flavonoids and phenolic acids, of which kaempferol and chlorogenic acid were the most predominant compounds in the extracts from the inflorescences and leaves, respectively.

Keywords: medicinal plants; mitotic index; *Allium cepa*; *sabugueiro*; high-performance liquid chromatography.

REFERÊNCIAS

Alice CB, Siqueira NCS, Halbig JC, Mentz LA, Silva GAAB e Goettems EI. 1990. Diagnose comparativa de compostos polifenólicos de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. Rev Bras Farm 71(4): 88-90.

Alice CB, Vargas VMF, Silva GAAB, de Siqueira NCS, Schapoval EES, Gleve J, Henriques JAP e Henriques AT. 1991. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. J Ethnopharmacol 35:165-171.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. 10 mar. 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p.52-59.

Alaerts G, Matthijs N, Verbeke J e Heyden Y. 2007. Chromatographic fingerprint development for herbal extract: A screening and optimization methodology on monolithic columns. J Chromatogr A 1172(1): 1-8.

Bacigalupo NM. 1974. Caprifoliaceae. In: Burkart A. Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina), v.6, Buenos Aires: INTA, p.50-52.

Bagatini MD, Silva ACF e Tedesco SB. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn 17: 444-447.

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

Bianchi MLP e Antunes LMG. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev Nutr 12(2): 123-130.

Boligon AA et al. 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. Acta Physiol Plant 35: 2229-2239.

- Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS e Vicentini VEP. 2002. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet Mol Biol* 25: 85-89.
- Cechinel Filho V e Yunes RA. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Quim Nova* 21: 99-105.
- Cordell JL. 1995. A guide to developing clinical pathways. *MLO Med Lab* 27(4): 35-39.
- Cruz GL. 1979. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 599 p.
- Dias MG, Canto-Dorow TS, Coelho APD e Tedesco SB. 2014. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Rev bras plantas med* 16(2): 202-208.
- Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF e Nagem TJ. 2007. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28: 241-249.
- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF e Tedesco SB. 2007. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn* 17: 49-54.
- Fachinetto JM e Tedesco SB. 2009. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Rev Bras Plan Med* 11: 360-367.
- Frescura VD, Laughinghouse IV e Tedesco SB. 2012. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. *Caryologia* 65: 27-33.
- Fiskesjö G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102(1): 99-112.
- Gobbo-Neto L e Lopes NP. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30(2): 374-381.
- Guarrera PM, Forti G e Marignoli S. 2005. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J Ethnopharmacol* 96: 429-444.
- Guerra M e Souza MJ. 2002. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC.

- Hamburger M e Hostettmann K. 1991. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry* 30(12): 3864-3874.
- Hollman PCH, Van Trip JMP e Buysman MNCP. 1996. Fluorescence detection of flavonols in HPLC by post-column chelation with aluminium. *Anal Chem* 68:3511-3515.
- Jorge LIF, Graciano RAS, Prado SPT e Pereira U. 1999. Identificação histológica de *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. (Sabugueiro). *Rev Ciên Farm* 20: 117-123.
- Kamdem JP, Olalekan EO, Hassan W, Kade J, Yetunde O, Boligon AA, Athayde ML, Souza DO e Rocha JBT. 2013. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Ind Crop Prod* 50: 625- 632.
- Knoll MF, Silva ACF, Canto-Dorow TS e Tedesco SB. 2006. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genet Mol Biol* 29: 539-542.
- Kutchan TM. 2001. *Plant Physiology* [S.I.] 125, 58.
- Leme DM e Marin-Morales MA. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. *Mutat Res* 650: 80-86.
- Lorenzi H e Matos FJA. 2002. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*, Instituto Plantarum, São Paulo, 512p.
- Lorenzi H e Matos FJA. 2008. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 544p.
- Martins ER, Castro DM, Castellani DC e Dias J E. 2000. *Plantas Medicinais*. Viçosa : UFV, 220p.
- Nogueira MJC. *Fitoterapia popular e enfermagem comunitária* [tese]. 1983. São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da USP.
- Nora GD, Pastori T, Laughinhouse IV HD, Canto-Dorow TS e Tedesco SB. 2010. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell* 34: 95-101.
- Pavanelo LB. Potencial antiproliferativo e determinação de compostos fenólicos de *Cordia trichotoma* (VELL.) ARRÁB. ex STEUD. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- Pelzer L, Guardia T, Juarez A e Guerreiro E. 1998. Acute and chronic Anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco* 53: 421-424.
- Peron AP, Canesin EA e Cardoso CMV. 2009. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. *R bras Bioci* 7(2): 155-159.

Pinho DS, Sturbelle RT, Martinho-Roth MG e Garcias GL. 2010. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Rev Bras Farmacogn 20: 65-170.

Reitz R. 1985. Caprifoliáceas. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí. Fasc., 16 p.

Scopel M. Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

Shahidi F, Janitha PK e Wanasundara PD. 1992. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 32(1): 67-103.

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

Silva FAS e Azevedo CAV de. 2009. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Soares SE. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev Nutr 15(1): 71-81.

Souza LFB, Laughinghouse IV HD, Pastori T, Tedesco M, Kuhn AW, Canto-Dorow TS e Tedesco SB. 2010. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. Int J Environ Stud 67: 871-877.

Sturbelle RT, Pinho DS, Restani RG, Oliveira GR, Garcias GL e Martino-Roth MG. 2010. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. Rev Bras Farmacogn 20(3): 409-415.

Taiz L e Zeiger E. 2013. Fisiologia Vegetal. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p.

Tedesco SB and Laughinghouse IV HD. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Environmental Contamination. Rijeka: Intech Publisher, p. 137-156.

Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS e Vicentini VEP. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. Genet Mol Biol 26(4): 551-555.

Zuanazzi JAS. Flavonoides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR. 2001. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 833 p.

Tabela 1. Células em interfase, mitose e índice mitótico de células de radículas de *Allium cepa* L. tratadas com extratos aquosos de inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schldl.

Tratamentos	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
T1: água destilada ¹	3686	314	7,85 ^{a*}
T2: extrato inflorescências 3 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3903	97	2,42 ^c
T3: extrato folhas 3 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3778	222	5,5 ^b
T4: extrato inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3970	30	0,75 ^d
T5: extrato folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3968	32	0,8 ^d
T6: extrato inflorescências 3 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3958	42	1,05 ^d
T7: extrato folhas 3 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3926	74	1,85 ^c
T8: extrato inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3962	38	0,95 ^d
T9: extrato folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3961	39	0,97 ^d
T10: glifosato 1% (glifo) ²	3793	207	5,17 ^b
T11: glifo + 24h água destilada	3828	172	4,3 ^b
T12: glifo + 24h inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3799	201	5,02 ^b
T13: glifo + 24h folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	3876	124	3,1 ^c
T14: glifo + 24h inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3798	202	5,05 ^b
T15: glifo + 24h folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	3809	191	4,77 ^b
CV (%) ³	-	-	30.36

¹ Controle negativo; ² Controle positivo; ³ Coeficiente de variação. * Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2. Alterações cromossômicas em células de radículas de *Allium cepa* L. tratadas com extratos aquosos de inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schldl.

Tratamentos	Alterações cromossômicas			Média de alterações
	MN [#]	Pontes em anáfase e telófase	Cromossomo perdido/quebras	
T1: água destilada ¹	-	-	-	0 ^{d*}
T2: extrato inflorescências 3 g.L ⁻¹ (acesso 1)	-	1	1	0,5 ^d
T3: extrato folhas 3 g.L ⁻¹ (acesso 1)	-	-	-	0 ^d
T4: extrato inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	-	-	-	0 ^d
T5: extrato folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	-	-	-	0 ^d
T6: extrato inflorescências 3 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	-	-	0 ^d
T7: extrato folhas 3 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	-	-	0 ^d
T8: extrato inflorescências 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	-	1	0,25 ^d
T9: extrato folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	2	-	0,5 ^d
T10: glifosato 1% (glifo) ²	-	37	13	12,5 ^a
T11: glifo. + 24h água destilada	-	16	1	4,25 ^b
T12: glifo. + 24h infloresc. 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	2	23	2	6,75 ^b
T13: glifo. + 24h folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 1)	1	8	2	2,7 ^c
T14: glifo. + 24h infloresc. 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	12	9	5,2 ^b
T15: glifo. + 24h folhas 12 g.L ⁻¹ (acesso 2)	-	9	1	2,5 ^c
CV (%) ³	-	-	-	67,06

¹Controle negativo; ²Controle positivo; ³Coefficiente de variação. * Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. [#]Micronúcleos.

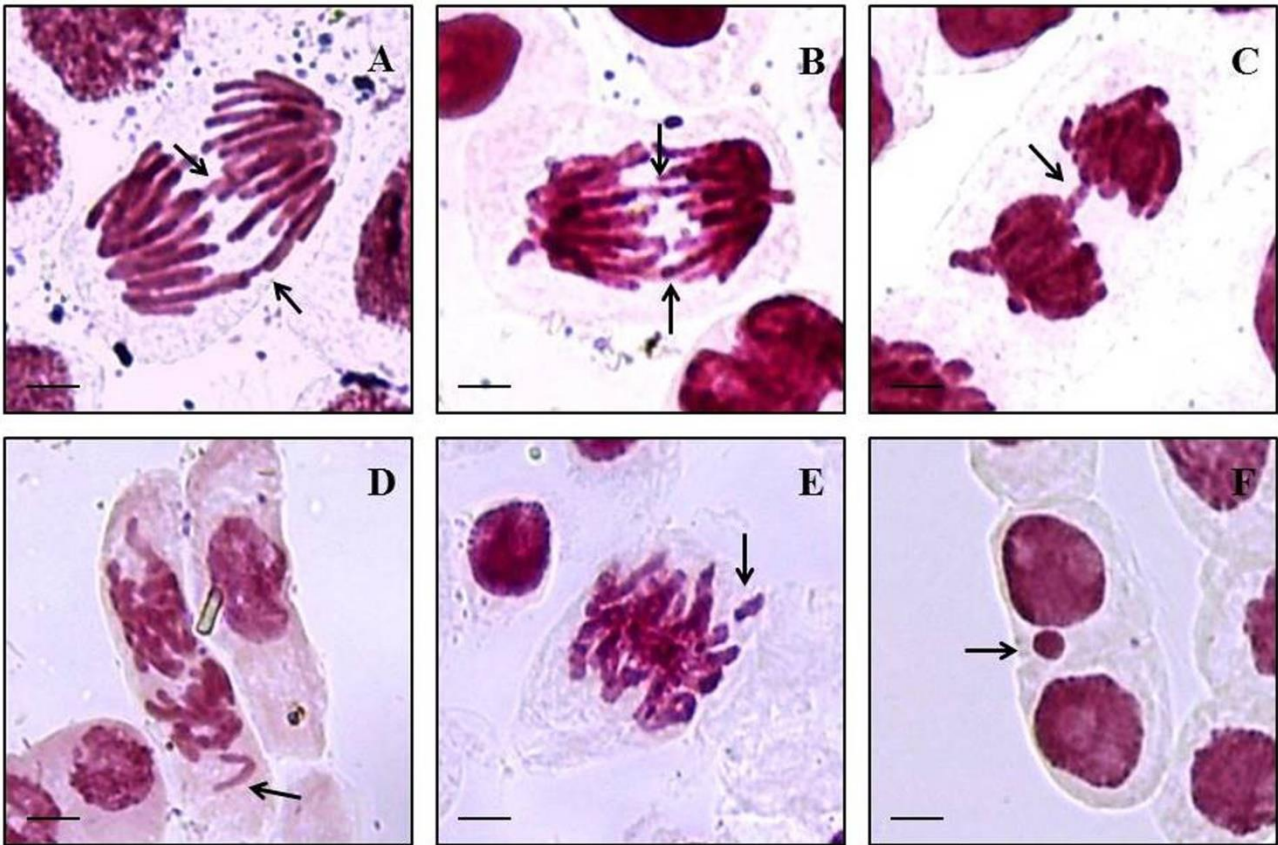


Figura 1. Células de raízes de *Allium cepa* L. submetidas aos extratos aquosos de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. A - setas indicando pontes anafásicas (células tratadas com extratos aquosos das inflorescências 3 g.L⁻¹, acesso 1); B - setas indicando pontes anafásicas (células tratadas com glifosato 1%); C - seta indicando telófase com ponte (células tratadas com glifosato 1%); D - seta indicando cromossomo perdido (células tratadas com extratos aquosos das inflorescências 12 g.L⁻¹, acesso 2); E - seta indicando quebra cromossômica (células tratadas com glifosato 1%); F - seta indicando micronúcleos (células tratadas com glifo + 24 horas folhas 12 g.L⁻¹, acesso 2). Escala de 10µm.

Tabela 3 – Compostos fenólicos (mg.g^{-1}) de extratos aquosos das inflorescências de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. na concentração de 12 g.L^{-1} em Santa Maria, RS (acesso 1) e Erechim, RS (acesso 2). CV% = 0,68.

Compostos/infloresc.	Acesso 1	Acesso 2	LOD [#] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOQ [#] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido gálico	7.6100 ^{fA*}	5.5067 ^{fB}	0.023	0.075
Ácido clorogênico	18.3867 ^{bA}	12.0900 ^{cB}	0.008	0.026
Ácido cafeico	7.4933 ^{fA}	5.5233 ^{fB}	0.015	0.049
Ácido elágico	12.0800 ^{cB}	14.6500 ^{bA}	0.027	0.093
Rutina	8.563 ^{eB}	10.2433 ^{dA}	0.019	0.062
Quercitrina	5.3967 ^{gA}	2.313 ^{gB}	0.013	0.042
Quercetina	2.2800 ^{hA}	2.3033 ^{gA}	0.024	0.079
Isoquercitrina	11.7400 ^{dA}	6.6800 ^{eB}	0.017	0.056
Canferol	20.9600 ^{aA}	20.2300 ^{aB}	0.035	0.115

* Médias com a mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. [#] LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

Tabela 4 – Compostos fenólicos (mg.g^{-1}) de extratos aquosos das folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. na concentração de 12 g.L^{-1} em Santa Maria, RS (acesso1) e Erechim, RS (acesso 2). CV% = 0,40.

Compostos/folhas	Acesso 1	Acesso 2	LOD [#] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOQ [#] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido gálico	5.6700 ^{gB*}	7.7700 ^{eA}	0.023	0.075
Ácido clorogênico	18.7500 ^{aA}	17.0900 ^{aB}	0.008	0.026
Ácido cafeico	9.7533 ^{cA}	9.6433 ^{dB}	0.015	0.049
Ácido elágico	8.0200 ^{eB}	10.1800 ^{cA}	0.027	0.093
Rutina	5.8200 ^{fB}	11.7133 ^{bA}	0.019	0.062
Quercitrina	7.9267 ^{eA}	3.2633 ^{hB}	0.013	0.042
Quercetina	4.0667 ^{hB}	5.9433 ^{gA}	0.024	0.079
Isoquercitrina	11.4467 ^{bA}	1.4500 ^{iB}	0.017	0.056
Canferol	8.1233 ^{dA}	7.2900 ^{fB}	0.035	0.115

* Médias com a mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. [#] LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

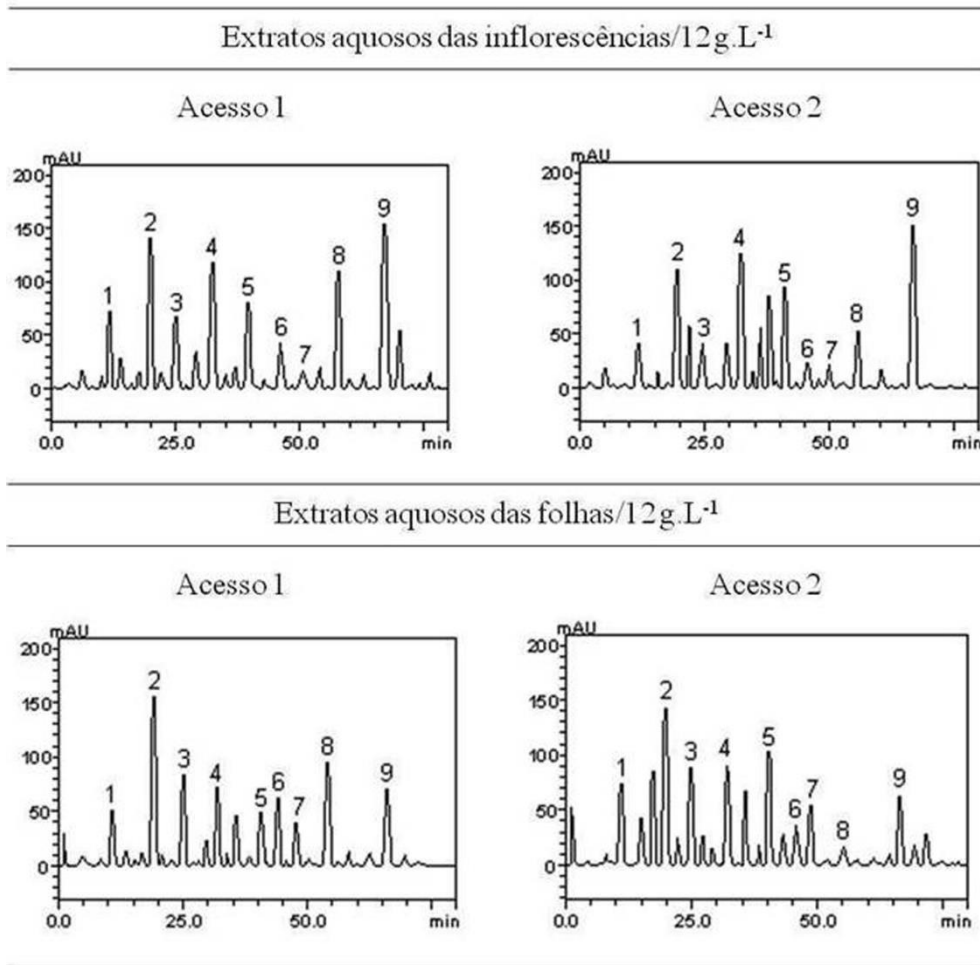


Figura 2. Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos aquosos das inflorescências e folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. dos dois acessos estudados (Acesso 1: Santa Maria – RS; Acesso 2: Erechim – RS). Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), ácido elágico (pico 4), rutina (pico 5), quercitrina (pico 6), isoquercitrina (pico 7), quercetina (pico 8) e canferol (pico 9).

ARTIGO 2 ¹

Comportamento meiótico e estimativa da viabilidade polínica de acessos de

Sambucus australis Cham. & Schltld. (ADOXACEAE)²

Marília Tedesco³, Andrielle Wouters Kuhn⁴, Viviane Dal-Souto Frescura⁵, Solange

Bosio Tedesco⁶, Antonio Carlos Ferreira da Silva⁷

RESUMO

Sambucus australis Cham. & Schltld., conhecida popularmente como sabugueiro, é uma planta utilizada na medicina alternativa por suas ações diaforética, anti-inflamatória e analgésica. Para potencializar a utilização desta espécie medicinal nativa e também fornecer a caracterização citogenética que auxilie, posteriormente, programas de preservação e melhoramento genético, o objetivo deste estudo foi caracterizar o comportamento meiótico, bem como estimar a viabilidade polínica de diferentes acessos de *S. australis* do Rio Grande do Sul através de distintos corantes. Para isso, os botões florais de 15 acessos foram coletados, fixados em etanol:ácido acético (3:1) e conservados em etanol 70% até o uso. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das anteras. Para a análise meiótica foi utilizado o coranteorceína acética 2%, sendo analisadas todas as fases e determinado o índice meiótico. Para a estimativa da viabilidade polínica foram utilizados três corantes: reativo de Alexander,orceína acética 2% e carmim acético 2%. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Nos 12 acessos analisados a meiose foi regular, apresentando associações cromossômicas preferencialmente em bivalentes, encontrando-se n=19 e os valores de índice meiótico foram superiores a 90%. Quanto à viabilidade polínica, a maioria dos acessos apresentou uma alta porcentagem de polens viáveis (acima de 75%), exceto o acesso ERE01 (44%). Na comparação entre os corantes, o reativo de Alexander foi considerado o mais indicado para estimar a viabilidade polínica da espécie. Assim, pode-se concluir que os acessos

¹Este artigo foi elaborado conforme normas da Revista Ceres.

²Este trabalho é parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

³Bióloga, estudante de pós-graduação, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Biologia, Av. Roraima 1000 – Cidade Universitária; CEP- 97119900 - Santa Maria/RS/Brasil, e-mail: marilia_tedesco@hotmail.com (Autor para correspondência)

⁴Bióloga, estudante de pós-graduação, UFSM, e-mail: andri-kuhn@hotmail.com

⁵Professora, UFSM, campus Cachoeira do Sul, Coordenadoria Acadêmica, e-mail: vividfrescura@yahoo.com.br

⁶Professora, UFSM, departamento de Biologia, e-mail: solatedesco@yahoo.com.br

⁷Professor, UFSM, departamento de Biologia, e-mail: acfsilva2@uol.com.br

de *S. australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, altos valores de índice meiótico e alta porcentagem de polens viáveis.

Palavras-chave: sabugueiro, citogenética, meiose, grãos de pólen, corantes.

ABSTRACT

Meiotic behavior and estimative pollen viability of accesses of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (ADOXACEAE)

Sambucus australis, popularly known as “sabugueiro”, is a plant used in alternative medicine for its diaphoretic, anti-inflammatory and analgesic actions. To encourage the use of this medicinal species native and also enable cytogenetic characterization to assist subsequently preservation programs and genetic improvement, the objective of this study was to characterize the meiotic behavior and to estimate the pollen viability of different accesses of *S. australis* from Rio Grande do Sul by different stains. To this end, the floral buds of 15 accesses were collected, fixed in ethanol:acetic acid (3:1) and stored in 70% ethanol until use. Slides were prepared using the squashing technique of the anthers. For meiotic analysis, 2% acetic-orcein staining was used, where all phases were analyzed and the meiotic index determined. Three stains were used to estimate pollen viability: Alexander’s reaction, 2% acetic-orcein, and 2% acetic-carmin. Data were analyzed by the Scott-Knott test at 5% significance level. In the 12 accesses analyzed, meiosis was regular, exhibiting chromosome associations preferably in bivalents, finding $n=19$ while meiotic index values exceeded 90%. Regarding pollen viability, the majority of the accesses had a high percentage of viable pollens (over 75%), except for the ERE01 access (44%). On the staining comparison, Alexander’s reaction proved the most suitable method for estimating the pollen viability of the specie. Therefore, it can be concluded that the accesses of *S. australis* studied exhibited regular meiotic behavior, gametic number $n = 19$, high meiotic index values and a high percentage of viable pollens.

Key words: sabugueiro, cytogenetic, meiosis, pollen grains, stains.

INTRODUÇÃO

Adoxaceae é uma pequena família botânica de plantas dentro da ordem Dipsacales, sendo constituída por três gêneros com 150 a 200 espécies (Sobral *et al.*,

2006). *Sambucus australis* Cham. & Schltndl., pertencente à essa família, caracteriza-se pelo porte arbustivo a arvoreta de 3 a 4 metros de altura, de copa irregular e bastante ramificada, com tronco tortuoso e casca fissurada. As folhas são compostas imparipinadas, com 7 a 13 folíolos membranáceos, de superfície brilhante, com nervuras salientes, que exalam odor desagradável quando amassadas. As flores são pequenas, de cor branca, odoríferas, reunidas em inflorescências corimbosas terminais. O androceu é formado por cinco estames epipétalos, que podem apresentar filetes curtos ou longos. O gineceu é formado por cinco carpelos soldados entre si, com cinco lóculos e cinco rudimentos seminiais. Os frutos são drupas globosas, de cor roxo-escuro quando maduros, contendo de 3 a 5 sementes (Bacigalupo, 1974; Reitz, 1985; Nunes *et al.*, 2007; Lorenzi & Matos, 2008).

Conhecida popularmente como sabugueiro, sabugueiro-do-rio-grande e sabugueiro-do-brasil (Nunes *et al.*, 2007), a espécie *S. australis* é uma planta nativa do Brasil, ocorrendo da Região Sudeste até o Rio Grande do Sul e no Paraguai, Argentina e Uruguai (Bacigalupo, 1974; Reitz, 1985). Essa planta é utilizada na medicina alternativa para o tratamento sintomático de moléstias eruptivas, gripes e resfriados e, também, por suas ações diaforética, anti-inflamatória e analgésica (Jorge *et al.*, 1999).

O conhecimento dos recursos genéticos associados às plantas medicinais tem assumido uma importância estratégica, já que o sistema de saúde deficitário e a baixa renda da população, juntamente com a sabedoria acumulada pelas comunidades, faz com que grande parte da população utilize as plantas medicinais como fonte de terapia (Scheffer *et al.*, 2009).

Portanto, devido à importância desse conhecimento e também ao fato de possuírem um grande potencial econômico, as espécies medicinais nativas do Brasil são

consideradas uma riqueza a ser preservada e utilizada, tornando-se necessário conservar a diversidade genética vegetal disponível. Assim, os estudos de caracterização de germoplasma são indispensáveis para potencializar a utilização dos recursos medicinais nativos e também para possibilitar que essas espécies sejam incluídas, posteriormente, em um programa de melhoramento genético (Pereira, 2006).

Entre esses estudos, a caracterização citogenética consiste em uma ferramenta eficiente no melhoramento e evolução de plantas, pois, ao mesmo tempo em que permite obter informações sobre o material genético, ajuda no fornecimento de métodos para manipulá-lo (Sybenga, 1998).

Os estudos citogenéticos podem envolver a análise da meiose e da viabilidade polínica. A primeira apresenta relevância, já que é durante a meiose que ocorre a recombinação gênica, a mesma é considerada uma fonte de variabilidade genética que os indivíduos possuem para se adaptar ao meio ambiente em que vivem e, assim, garantir a sua perpetuação por meio da descendência (Singh, 1993; Nassar & Freitas, 1997; Pagliarini, 2000). A viabilidade do pólen também é uma característica muito importante no estudo das plantas, pois evidencia a potencialidade reprodutora do gameta masculino de uma espécie e contribui em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações necessárias para a aplicação prática na conservação genética, na agricultura e para o planejamento de algum tipo de melhoramento (Arroyo, 1981; Guinet, 1989).

Baseado nesse contexto e também devido à inexistência de estudos que informem a respeito do comportamento meiótico e viabilidade polínica de *S. australis*, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente diferentes acessos

dessa espécie, coletados no Rio Grande do Sul – Brasil, com base na análise da meiose e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através de distintos corantes.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN), do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

O material botânico utilizado compreendeu botões florais de 15 acessos de *S. australis* coletados em sete municípios do Estado do Rio Grande do Sul, dos quais, dependendo da fase de desenvolvimento do botão, foram analisadas as fases da meiose e/ou a viabilidade dos grãos de pólen (Tabela 1). Os botões florais mais jovens de até 3 mm foram utilizados para o estudo do comportamento meiótico e os demais, para análise da viabilidade polínica. O material testemunho foi incorporado ao Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB) da UFSM (Tabela 1).

Para análise da meiose e estimativa da viabilidade polínica, os botões florais coletados em diversos estádios de desenvolvimento foram fixados em Carnoy modificado 3:1 (etanol:ácido acético) durante 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, os botões foram transferidos para etanol 70% sob refrigeração até sua utilização. Para o preparo das lâminas, foi usada a técnica de esmagamento das anteras (Guerra & Souza, 2002). Ressalta-se que, apesar das flores apresentarem estames com filetes curtos e longos (pistiladas e estaminadas), a escolha dos botões florais foi realizada aleatoriamente.

Para a análise meiótica (12 acessos, Tabela 1), a coloração das anteras foi realizada comorceína acética 2%. Foram analisadas em média seis lâminas por acesso, que possuíam o maior número de células em cada uma das fases da divisão meiótica.

Todas as fases da meiose foram analisadas, mas foi dada ênfase especial às associações cromossômicas em diacinese e a segregação dos cromossomos nas anáfases e telófases I e II. Em diacinese foram registradas as associações cromossômicas, considerando a ocorrência de bivalentes, trivalentes e tetravalentes. As células que apresentaram todos os seus cromossomos em associações bivalentes foram consideradas como normais ou de comportamento regular. Para determinação do número cromossômico gamético (n) observou-se de cinco a 20 células em diacinese (com bom espalhamento dos cromossomos) por acesso. Também foram registradas as células que apresentaram cromossomos retardatários, pontes ou disjunção irregular.

O número de tétrades foi registrado e calculado o índice meiótico (Love, 1949), em que: IM (índice meiótico) é igual ao número de tétrades de pólen normais dividido pelo número total de tétrades observado multiplicado por 100. O cálculo foi realizado a partir de um número variável de tétrades por acesso. As tétrades normais foram aquelas que apresentaram quatro células, ao passo que as anormais diferiram desse número.

Para realizar a estimativa da viabilidade polínica (14 acessos, Tabela 1), as lâminas foram preparadas também pela metodologia de esmagamento das anteras, porém, para a coloração, foram utilizados três corantes:orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Ao utilizar os corantesorceína acética 2% e carmim acético 2%, os pólenes corados foram considerados viáveis e, os não corados, ou corados fracamente, inviáveis. Já com o corante reativo de Alexander, as lâminas foram analisadas 24 horas após o preparo e foram considerados viáveis os grãos de pólen de

cor púrpura e inviáveis os azuis-esverdeados. Além disso, os grãos de pólen diminutos foram considerados inviáveis para todos os corantes. Foram confeccionadas duas lâminas por acesso e corante, onde foi realizada a contagem de 600 grãos de pólen (300 em cada lâmina). A viabilidade do pólen foi estimada através da porcentagem de grãos viáveis, dividindo-se o número de grãos viáveis pelo total de grãos contados multiplicados por 100.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados referentes à análise meiótica e à viabilidade polínica foram comparados através do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa Assistat® versão beta 7.7 (Silva & Azevedo, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise meiótica

Os resultados obtidos das análises nas fases da meiose estão registrados na Tabela 2. Nos 12 acessos de *S. australis*, tanto na meiose I como na meiose II, a amplitude de variação da porcentagem de células anormais ficou contida entre 0,46% a 3,28%, não havendo diferença estatística entre os acessos (Tabela 2). Desta forma, o comportamento meiótico foi considerado regular durante a meiose I e II para todos os acessos (Tabela 2, Figuras 1A a 1I). No entanto, algumas irregularidades foram observadas, tais como a presença de díades, tríades (Figura 2I), cromossomos retardatários em metáfases (Figuras 2B e 2C), pontes em anáfase I (Figura 2D), telófase I (Figura 2E) e anáfase II (Figura 2F), não disjunção na anáfase II (Figura 2G) e telófase II com fuso multipolar e micronúcleo (Figura 2H).

As células em diacinese e/ou metáfase I apresentaram frequentemente sobreposições e/ou aderências nos cromossomos, o que dificultou a interpretação das associações cromossômicas. Por isso, foram analisadas somente as células em diacinese e/ou metáfase I que não apresentaram sobreposição nos cromossomos. Nas células consideradas regulares, foi possível determinar a presença de 19 cromossomos em bivalentes (Figura 1A e 1B), enquanto nas células irregulares observaram-se associações maiores que bivalentes, que poderiam ser trivalentes e/ou tetravalentes (Figura 2A) e univalentes.

Através da análise da meiose foi possível determinar o número gamético $n = 19$, sugerindo-se que o número somático de *S. australis* seja $2n = 38$ cromossomos. Na literatura há um único relato sobre contagem cromossômica para *S. australis*, onde $2n = 37$ (Goldblatt, 1996), diferindo do que foi sugerido no presente trabalho. Porém, para outras espécies do gênero *Sambucus* L., como *S. caerulea* Raf., *S. callicarpa* Greene, *S. melanocarpa* A. Gray e *S. sachalinensis* Pojark., o número somático $2n = 38$ foi confirmado (Goldblatt, 1996).

Esse estudo possibilitou, pela primeira vez, realizar a determinação do número de cromossomos através de células gaméticas de *S. australis* em acessos do Rio Grande do Sul (RS). Olkoski *et al.* (2008) também utilizaram células gaméticas para determinar o número de cromossomos de três espécies medicinais nativas do Rio Grande do Sul. Os autores encontraram $n = 10$ para *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron. e $n = 9$ para *Pterocaulon polystachyum* DC. e *Solidago microglossa* DC., sugerindo números somáticos $2n = 20$ e $2n = 18$, respectivamente.

O índice meiótico apresentou-se alto, com variação entre os acessos de 91,1 a 100% (Tabela 2), sendo encontradas tétrades normais com quatro células (Figura 1H e

II) e anormais com três (Figura 2I) e duas células. Nos acessos SM02 e CRA08 não ocorreram células em tétrades, tendo em vista a fase de desenvolvimento que os botões florais se encontravam. De acordo com Love (1949), plantas com índice meiótico superior a 90% são consideradas estáveis citologicamente e, portanto, podem fazer parte tanto de programas de melhoramento genético quanto nos de preservação da espécie. Por ser um parâmetro simples, esse índice é muito utilizado em estudos de comportamento meiótico de plantas. Para a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (espineira-santa), Lunardi *et al.* (2004) estimaram um índice meiótico que variou de 95,1 a 100% para os sete acessos estudados. Fachinetto & Tedesco (2009), estudando cinco acessos de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. (betônica-brava), determinaram que o índice meiótico ficou contido entre 71,1 a 92,3%. Em linhagens avançadas de pimenta do gênero *Capsicum* L., o índice meiótico foi superior a 90%, exceto em uma linhagem que apresentou o índice de 79,53% (Pozzobom *et al.*, 2011), enquanto em espécies do gênero *Passiflora* L., os índices meióticos variaram de 88,4 a 98,1% (Souza & Pereira, 2011).

Apesar de terem sido observadas algumas irregularidades, essas não foram significativas em nenhum dos acessos estudados, que mantiveram um elevado número de tétrades normais e um índice meiótico (IM) acima de 90%. Tedesco *et al.* (2002) estudaram o comportamento meiótico de 38 acessos de *Adesmia* DC. e verificaram que, embora algumas irregularidades como uni, tri e tetravalentes, bem como cromossomos retardatários e pontes na anáfase I e II tenham sido eventualmente observadas, o índice meiótico foi normalmente superior a 90% em todos os acessos.

Viabilidade polínica

Neste trabalho foi realizada uma estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de 14 acessos utilizando-se três diferentes corantes. Na Tabela 3 encontram-se os resultados da comparação das estimativas da viabilidade polínica entre os diferentes acessos e corantes.

Pela análise dos resultados, pode-se observar que o corante orceína acética 2% foi o que apresentou a maior média de porcentagem de polens viáveis (99,8%), porém, sem diferir significativamente da média do corante carmim acético 2% (97,5%). Já o corante reativo de Alexander foi o que apresentou a menor média de viabilidade polínica (86,4%), diferindo estatisticamente dos outros dois corantes (Tabela 3).

Na comparação entre os corantes, dentro de cada acesso, o acesso ERE01 apresentou diferenças significativas nas porcentagens de viabilidade polínica entre os três corantes. Nos acessos CRA07, TUP11, SIL13, ITA16 e CRA17, os grãos de pólen corados com reativo de Alexander diferiram significativamente dos grãos corados com orceína acética 2% e carmim acético 2%. Nos demais acessos, os três corantes não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Considerando os resultados obtidos para os três corantes, foi possível constatar que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica, pois não permitiu distinguir corretamente as tonalidades entre polens viáveis e inviáveis (Figuras 3D, 3E e 3F). Apesar de possibilitar uma maior diferenciação entre polens viáveis e inviáveis (Figuras 3G, 3H e 3I), o corante carmim acético 2% também pode ter superestimado a viabilidade polínica, já que, segundo Munhoz *et al.* (2008), algumas vezes os grãos de pólen abortados podem fornecer coloração semelhante àquela de grãos viáveis. Por sua vez, o corante reativo de Alexander foi considerado o melhor para estimar a viabilidade

polínica neste trabalho, pois permitiu diferenciar com precisão o pólen viável do inviável. Isso se deve ao fato do reativo de Alexander ser formado pelos corantes fucsina ácida e verde de malaquita e esses produzirem uma coloração diferencial entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. A celulose na parede celular do pólen reage com o verde de malaquita produzindo uma cor azul-esverdeada, enquanto o protoplasma reage com a fucsina ácida produzindo uma cor púrpura (Alexander, 1980). Assim, como os grãos inviáveis não apresentam protoplasma, eles apresentam a cor azul-esverdeada (3A e 3B), ao passo que os grãos viáveis apresentam a parede celulósica azul-esverdeada e o protoplasma de cor púrpura (3C).

Frescura *et al.* (2012) utilizaram os mesmos corantes do presente trabalho para estimar a viabilidade polínica de 20 acessos de *Polygala paniculata* L. (barba-de-bode). Através dos resultados, os autores verificaram que houve diferença significativa nas médias de viabilidade polínica entre os três corantes (orceína acética: 98,3%; carmim acético: 80,4%; reativo de Alexander: 72,3%) e concluíram que a orceína acética superestimou a viabilidade, enquanto o reativo de Alexander foi considerado o corante mais adequado para a estimativa da viabilidade polínica dessa planta.

No presente estudo, a viabilidade polínica foi considerada alta (acima de 75%) para todos os acessos e corantes, exceto para o acesso ERE01, quando se utilizou o corante reativo de Alexander (44%).

Alta porcentagem de viabilidade polínica com diferentes testes colorimétricos também foi encontrada por diversos autores estudando espécies medicinais. Auler *et al.* (2006) utilizaram os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander para estimar a viabilidade polínica de oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) e encontraram valores superiores a 85%. Utilizando o corante carmim

acético 2%, Loguercio & Battistin (2004) encontraram valores superiores a 93% de viabilidade polínica em nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão). Ainda, Battistin *et al.* (2006) estimaram a viabilidade polínica de populações de *Discaria americana* Gillies & Hook. (quina-do-campo) e *Foeniculum vulgare* Mill. (funcho) através dos corantes carmim propiônico e reativo de Alexander, obtendo valores superiores a 88% nessas duas espécies.

Na comparação entre os acessos, dentro de cada corante, não houve diferenças significativas entre os 14 acessos para os corantes orceína acética 2% e carmim acético 2%. Já para o corante reativo de Alexander, ocorreram diferenças entre os acessos. O acesso ERE01 diferiu significativamente de todos os demais acessos analisados, apresentando o maior número de polens inviáveis. Ainda para o reativo de Alexander, os acessos TUP11, SIL13, ITA16 e CRA17 foram semelhantes estatisticamente entre si, mas diferiram significativamente dos acessos ERE01, SM02, SM04, SM05, SM06, CRA07, FOR09, TUP10, SIL14 e SIL15 (Tabela 3).

A diferença observada nos valores da viabilidade polínica entre os acessos pode ser explicada por diversos fatores, como a variabilidade genética, além de causas não genéticas, que incluem o estágio do pólen e fatores físicos como temperatura e umidade (Kelly *et al.*, 2002)

Coelho *et al.* (2012), utilizando os corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander, atribuíram as diferenças na estimativa da viabilidade polínica de *Crotalaria juncea* L. à variabilidade genética presente nos diferentes acessos estudados. O mesmo pôde ser observado por Neto *et al.* (2006), que constataram que a presença de diferenças significativas na viabilidade dos grãos de pólen em diferentes populações de *Solanum paniculatum* L. (jurubeba) são indicativos de que existe variabilidade genética entre as

mesmas. Por fim, segundo Pozzobon *et al.* (2011), fatores abióticos como a alta temperatura na época de coleta das flores, podem ter sido responsáveis pela diferença na porcentagem de polens viáveis em algumas linhagens de pimenta.

Cabe ressaltar que uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais são reflexo direto de um processo meiótico regular (Corrêa *et al.*, 2005), como pode ser observado no presente trabalho.

CONCLUSÕES

Os acessos de *Sambucus australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, com associações bivalentes de $n=19$ cromossomos, índice meiótico superior a 90% e alto índice de viabilidade polínica, não apresentando número de irregularidades meióticas suficiente para comprometer a fertilidade da espécie. O corante reativo de Alexander foi considerado o mais eficiente para estimar a viabilidade polínica nessa espécie.

REFERÊNCIAS

Alexander MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, 55:13-18.

Arroyo MTK (1981) Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: Polhill M & Raven PH (Eds) *Advances in legumes systematics*, Kew: Royal Botanic Gardens. p.723-769.

Auler NMF, Battistin A & Reis MS (2006) 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 Mediciniais*, 8:55-63.

Bacigalupo NM (1974) Caprifoliaceae. In: Burkart A (Ed) *Flora Ilustrada de Entre Rios* (Argentina). Buenos Aires: INTA. p.50-52.

Battistin A, Conterato IF, Pereira GM, Pereira BL & Silva MF da (2006) Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8:56-62.

Coelho APD, Morais, KP, Laughinghouse IV HD, Giacomini SJ & Tedesco SB (2012) Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (FABACEAE). *Agrociencia*, 46(5): 481-487.

Corrêa MGS, Viegas J, Silva JB, Avila PFV, Busato GR & Lemes JS (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botanica Brasilica*, 19(2): 295-303.

Fachinetto JM & Tedesco SB (2009) Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Revista brasileira de plantas mediciniais*, 11:110-116.

Frescura VDS, Laughinghouse IV HD, Canto-Dorow TS & Tedesco SB (2012) Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different methods of staining. *Biocell*, 36(3):143-145.

Goldblatt P (1996) *Index to Plant Chromosome Numbers, 1992-1993*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 58: 1-276.

Guerra M & Souza MJ (2002) *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC. 131p.

Guinet PH (1989) *Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae*. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 842p.

Jorge LIF, Graciano RAS, Prado SPT & Pereira U (1999) Identificação histológica de *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. (Sabugueiro). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 20:117-123.

Kelly JK, Rasch A & Kalisz S (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*, 89: 1021–1023.

Lorenzi H & Matos FJA (2008) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum. 544p.

Love EM (1949) La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. Revista Argentina Agronomia, 16:1-13.

Loguercio AP & Battistin A (2004) Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, 11(1):192-205.

Lunardi MPM, Schifino-Wittmann MT & Barros IBI (2004) Chromosome number variability in the south american medicinal plant *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (Celastraceae). Cytologia, 69:439-445.

Munhoz M, Luz CFP, Meissner Filho PE, Barth OM & Reinert F (2008) Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. Revista Brasileira de Botânica, 31(2):209-214.

Nassar NMA & Freitas M (1997) Prospects of polyploidizing Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by unreduced microspores. Plant Breeding, 116:195-197.

Neto ODS, Karsburg IV & Yoshitome MY (2006) Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). Revista de Ciências Agro-Ambientais, 4(1):67-74.

Nunes E, Scopel M, Vignoli-Silva M, Vendruscolo GS, Henriques, AT & Mentz LA (2007) Caracterização farmacobotânica das espécies de *Sambucus* (Caprifoliaceae) utilizadas como medicinais no Brasil. Parte II. *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17:414-425.

Olkoski D, Laughinghouse IV HD, Silva ACF da & Tedesco SB (2008) Meiotic analysis of the germoplasm of three medicinal species from Asteraceae family. Ciência Rural, 38(6):1777-1780.

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

Pozzobon MT, Souza KRR, Carvalho SIC & Reifschneider FJB (2011) Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. Horticultura Brasileira, 29(2) 212-216.

Reitz R (1985) Caprifoliáceas. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí. Fasc. 16p.

Scheffer MC, Ming LC & Araujo AJ (2003) Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Disponível em: <http://www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaisconservacao.pdf>. Acessado em: 03 de dezembro de 2014.

Singh RJ (1993) Plant cytogenetics. Urbana: University of Illinois. 391p.

Silva FAS & Azevedo CAV de (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Sobral M, Jarenkow JA, Brack P, Irgang BE, Larocca J & Rodrigues RS (2006) Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos, RiMA/Novo Ambiente. 350p.

Souza MM & Pereira TNS (2011) Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. Revista Brasileira de Botânica, 34(1):63-72.

Sybenga J (1998) Forty years of cytogenetics in plant breeding a personal view. In: Lelley T (Ed.) Current Topics in plant cytogenetics related to plant improvement. Viena: Universitäts Verlag. p.22-33.

Tedesco SB, Schiffino-Wittmann MT & Dall'agnol M (2002) Meiotic behavior and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (Leguminosae). Caryologia, 55(4):341-347.

Tabela 1. Acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl., locais de coleta, número de registro no Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB) e tipo de análise realizada com cada acesso (comportamento meiótico/viabilidade polínica).

Acesso	Localização	Número de registro	Comportamento meiótico	Viabilidade polínica
ERE01	Erechim – RS	15.421		X
SM02	Santa Maria – RS	15.422	X	X
SM04	Santa Maria – RS	15.424	X	X
SM05	Santa Maria – RS	15.425	X	X
SM06	Santa Maria – RS	15.426	X	X
CRA07	Cruz Alta – RS	15.427		X
CRA08	Cruz Alta – RS	15.428	X	
FOR09	Formigueiro – RS	15.429	X	X
TUP10	Tupanciretã – RS	15.430	X	X
TUP11	Tupanciretã – RS	15.431	X	X
SIL13	Silveira Martins – RS	15.433	X	X
SIL14	Silveira Martins – RS	15.434	X	X
SIL15	Silveira Martins – RS	15.435	X	X
ITA16	Itaara – RS	15.436	X	X
CRA17	Cruz Alta – RS	15.437		X

Tabela 2. Comportamento meiótico, índice meiótico (IM) e porcentagem de células anormais em 12 acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

Acesso	NCA	Prófase I				Metáf. I		Anáf. I		Telóf. I		Próf. II		Metáf. II		Anáf. II		Telóf. II		Tétrades	Tétrades Anormais		IM (%)	%CA
		Leptóteno	Diacinese		N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N		A	Día.		
SM02	367	156	-	07	3	12	5	-	1	-	-	13	-	-	-	-	-	169	1	-	-	-	2,78 ^a	
SM04	601	320	1	10	6	3	2	-	1	14	-	21	-	10	-	4	-	129	-	80	-	-	100	1,85 ^a
SM05	481	125	-	05	3	5	-	-	-	9	-	50	1	19	-	7	-	232	-	25	-	-	100	0,56 ^a
SM06	482	170	-	07	4	56	3	-	-	38	1	24	-	8	-	20	-	76	-	75	-	-	100	1,86 ^a
CRA08	369	278	-	09	2	36	-	-	-	17	-	4	-	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	0,46 ^a
FOR09	612	375	-	12	3	-	-	-	-	-	-	6	-	15	-	-	-	100	-	92	3	6	91,1	1,91 ^a
TUP10	844	360	-	17	5	75	2	3	2	13	-	120	2	23	-	7	-	96	-	115	-	4	96,6	1,67 ^a
TUP11	668	508	-	06	2	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	123	-	4	96,8	0,93 ^a
SIL13	724	418	-	16	5	80	15	-	-	55	-	75	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	100	2,88 ^a
SIL14	342	25	-	19	7	30	-	1	-	17	1	28	-	6	-	8	1	181	-	18	-	-	100	2,22 ^a
SIL15	574	60	-	20	10	126	5	-	1	43	-	141	-	23	-	9	1	71	-	60	-	4	93,7	3,28 ^a
ITA16	594	174	-	20	9	6	-	2	-	14	1	65	-	24	1	18	3	175	-	80	-	2	97,6	2,65 ^a

*Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

NCA: número de células analisadas; IM: índice meiótico; %CA: porcentagem de células anormais; N: células normais; A: células anormais. Próf.: prófase; Metáf.: metáfase; Anáf.: anáfase; Telóf.: telófase.

Acessos: SM (Santa Maria); CRA (Cruz Alta); FOR (Formigueiro); TUP (Tupanciretã); SIL (Silveira Martins); ITA (Itaara).

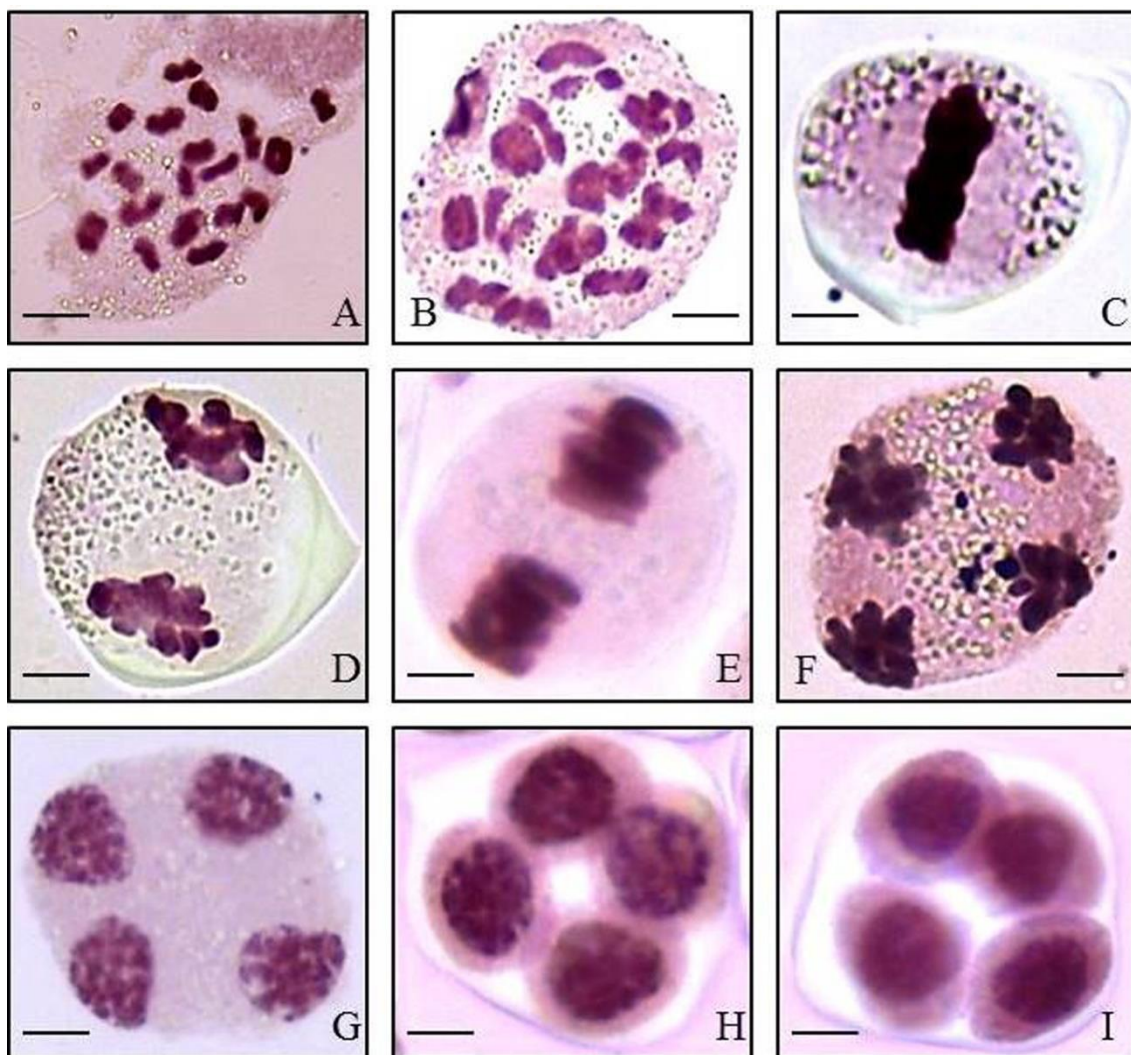


Figura 1. Comportamento meiótico de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. – células normais. A) diacinese (19II), acesso TUP10 (Tupanciretã); B) diacinese (19II), acesso SIL14 (Silveira Martins); C) metáfase I, acesso SM02 (Santa Maria); D) anáfase I, acesso SIL15 (Silveira Martins); E) metáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); F) anáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); G) Telófase II, acesso SM05 (Santa Maria); H) Tétrade, acesso SM04 (Santa Maria); I) Tétrade, acesso ITA16 (Itaara). Escala de 10 μ m.

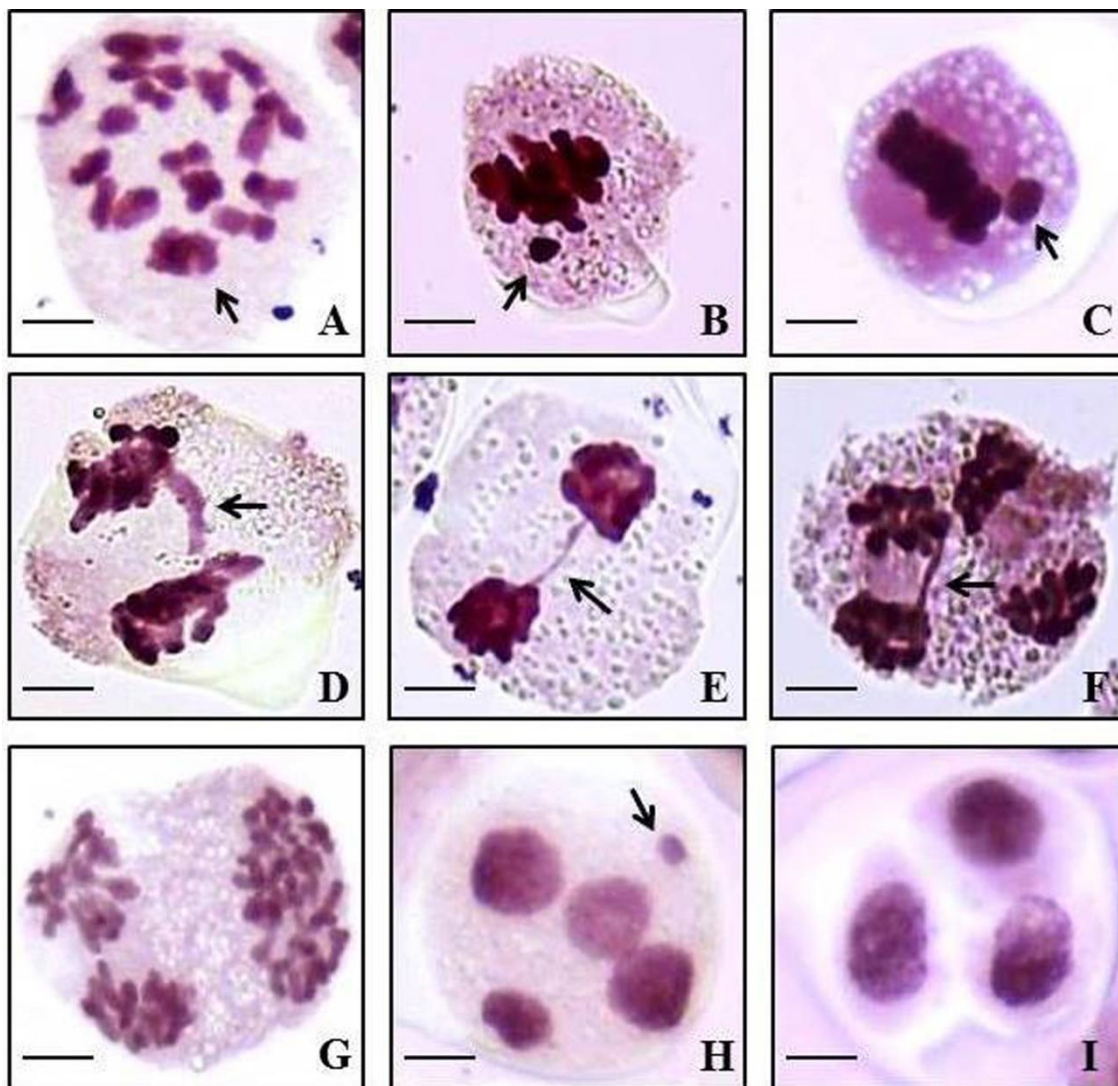


Figura 2. Comportamento meiótico de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. – células anormais. A) diacinese (17II+1IV) com tetravalente (seta), acesso FOR09 (Formigueiro); B) metáfase I com cromossomo retardatório (seta), acesso SM02 (Santa Maria); C) metáfase I com cromossomo retardatório (seta), acesso SIL13 (Silveira Martins); D) anáfase I com ponte (seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); E) telófase I com ponte (seta), acesso ITA16 (Itaara); F) anáfase II com ponte (seta), acesso SIL14 (Silveira Martins); G) Anáfase II com não-disjunção dos cromossomos, acesso SM02 (Santa Maria); H) telófase II com fuso multipolar e micronúcleo (seta), acesso SM05 (Santa Maria); I) Tríade, acesso TUP11 (Tupanciretã). Escala de 10 μ m.

Tabela 3. Porcentagem de polens viáveis e estimativa da viabilidade polínica (%) de 14 acessos de *Sambucus australis* Cham. & Schldl. através de três diferentes corantes.

Acesso	Reativo de Alexander		Orceína acética 2%		Carmim acético 2%	
	N*	% viabilidade	N	% viabilidade	N	% viabilidade
ERE01	264	44 ^{cC}	591	98,5 ^{aA}	518	86,4 ^{aB}
SM02	575	95,8 ^{aA}	600	100 ^{aA}	590	98,3 ^{aA}
SM04	552	92 ^{aA}	600	100 ^{aA}	571	95,2 ^{aA}
SM05	563	93,8 ^{aA}	600	100 ^{aA}	593	98,8 ^{aA}
SM06	573	95,5 ^{aA}	600	100 ^{aA}	584	97,3 ^{aA}
CRA07	533	88,8 ^{aB}	600	100 ^{aA}	600	100 ^{aA}
FOR09	587	97,7 ^{aA}	599	99,8 ^{aA}	586	97,7 ^{aA}
TUP10	576	96 ^{aA}	598	99,7 ^{aA}	588	98 ^{aA}
TUP11	493	82,2 ^{bB}	600	100 ^{aA}	597	99,5 ^{aA}
SIL13	457	76,2 ^{bB}	600	100 ^{aA}	598	99,7 ^{aA}
SIL14	565	94,2 ^{aA}	600	100 ^{aA}	571	95,2 ^{aA}
SIL15	567	94,5 ^{aA}	600	100 ^{aA}	599	99,8 ^{aA}
ITA16	463	77,2 ^{bB}	600	100 ^{aA}	600	100 ^{aA}
CRA17	497	82,3 ^{bB}	600	100 ^{aA}	597	99,5 ^{aA}
Média geral	518,8	86,4 ^B	599	99,8 ^A	585	97,5 ^A

*: número de polens viáveis. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

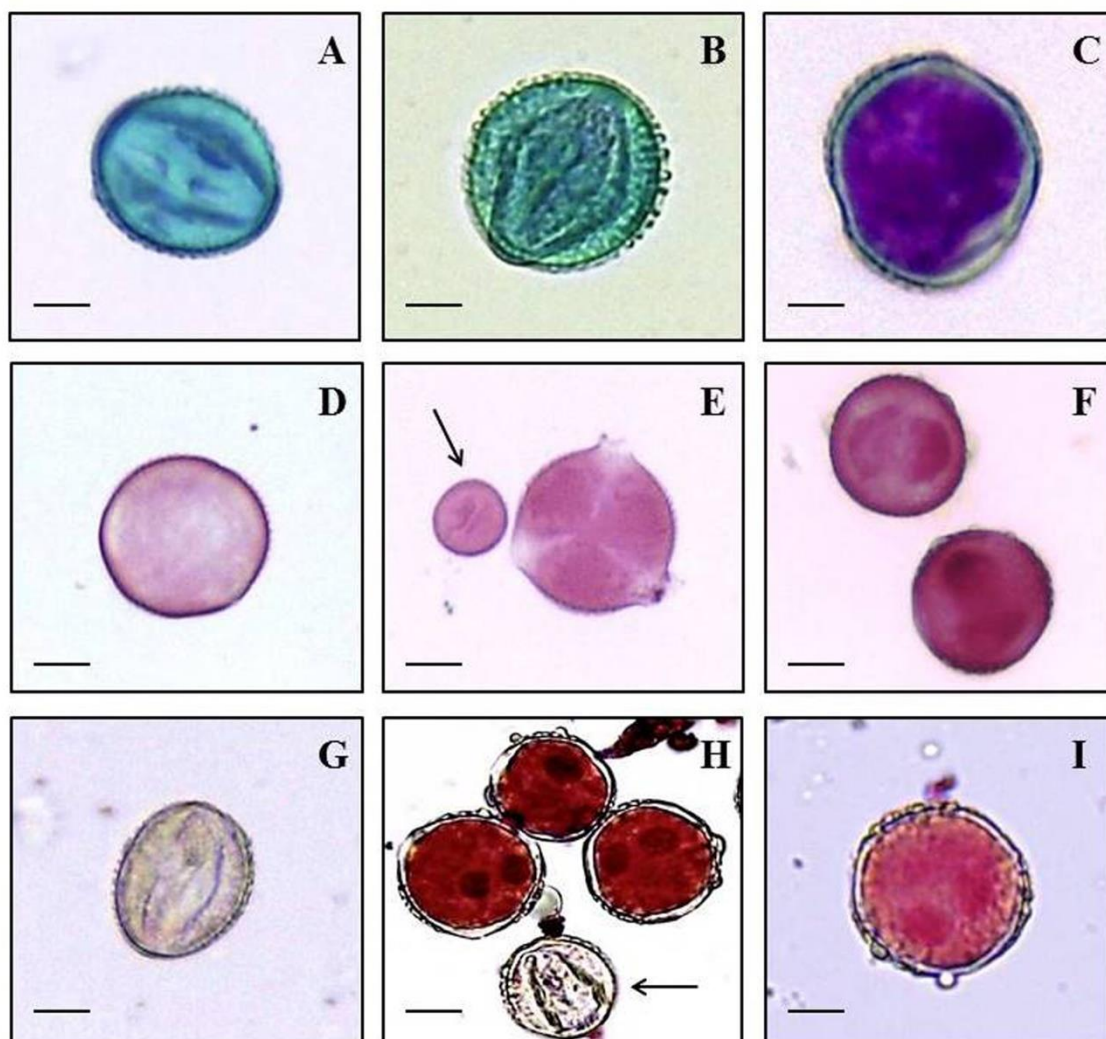


Figura 3. Polens viáveis e inviáveis de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. A – C: polens corados com reativo de Alexander. A) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); B) pólen inviável, acesso TUP11 (Tupanciretã); C) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta); D – F: polens corados com orcéina acética 2%. D) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); E) pólen viável e inviável (diminuto – seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); F) polens viáveis, acesso SM05 (Santa Maria); G – I: polens corados com carmim acético 2%. G) pólen inviável, acesso SM06 (Santa Maria); H) polens viáveis e pólen inviável (seta), acesso ERE01 (Erechim); I) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta). Escala de 10 μ m.

DISCUSSÃO

A ausência de estudos que informem sobre a caracterização citogenética e genotoxicidade de *Sambucus australis*, aliado a grande utilização das plantas medicinais, motivou o presente trabalho que descreve a atividade antiproliferativa, antigenotóxica e os compostos fenólicos dos extratos aquosos da espécie, além de analisar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica em acessos dessa planta.

Através do teste de *Allium cepa*, pode-se verificar que os extratos aquosos das inflorescências e folhas de *S. australis*, nos dois acessos analisados (Erechim e Santa Maria), apresentaram atividade antiproliferativa e essa atividade foi mais acentuada conforme o aumento da concentração dos extratos. Outros autores também analisaram a atividade antiproliferativa de extratos aquosos de diferentes espécies utilizando o sistema teste de *A. cepa* e constataram que esses extratos, nas maiores concentrações, provocaram uma maior inibição da divisão celular, como por exemplo: Frescura et al. (2012a), estudando a espécie *Luehea divaricata* Mart.; Knoll et al. (2006), ao analisar diferentes populações de *Pterocaulon polystachyum* DC.; Fachinetto et al. (2007) analisando os extratos de *Achyrocline satureioides* DC.; e, Bagatini et al. (2009), avaliando o efeito de infusões de *Solidago microglossa* DC.

A atividade antiproliferativa dos extratos aquosos avaliados neste trabalho pode ser conferida aos flavonoides encontrados na espécie *S. australis*, já que são atribuídos a esses compostos diferentes efeitos farmacológicos, entre eles, a ação antiproliferativa e a ação anticarcinogênica (HOLLMAN et al., 1996; PELZER et al., 1998).

Os extratos aquosos de *S. australis* não apresentaram efeito genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*, pois não foram encontrados valores expressivos no número de alterações cromossômicas. Ao contrário do encontrado neste trabalho, alguns extratos aquosos de plantas medicinais apresentaram efeito genotóxico, como as espécies *Baccharis trimera* (Less.) DC. e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (FACHINETTO; TEDESCO, 2009), *Mikania glomerata* Spreng. (NORA et al., 2010) e *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. (DIAS et al., 2014).

Neste estudo também foi avaliado o potencial antigenotóxico de *S. australis*, onde se verificou que os extratos aquosos das folhas de *S. australis* na maior concentração (12 g.L^{-1}), em ambos os acessos, apresentam atividade antigenotóxica. O mesmo pode ser observado quando se testou a atividade antimutagênica de soluções de *Aloe vera* (L.) Burm. f. utilizando-se o teste de *A. cepa* (STURBELLE et al., 2010).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos das inflorescências e folhas de *S. australis* na concentração de 12 g.L⁻¹ permitiu a identificação dos compostos ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol, corroborando com estudos realizados por Alice et al. (1990), onde foram encontrados nas inflorescências de *S. australis* os compostos 3-O-monoglicosídeo de diidroflavonol, 3,7-O-diglicosídeo de flavonol, isoquercitrina, rutina, quercetina, ácido cafeico e ácido clorogênico; e Scopel (2005), onde foram observados ácidos fenólicos, glicosídeos de flavonoides (sem possíveis indicações), hiperosídeo, isoquercitrina, derivado de canferol, quercitina e canferol em extratos hidroetanólicos da mesma espécie.

Além das análises relacionadas à atividade antiproliferativa e antígeno-tóxica dos extratos aquosos de *S. australis*, foram realizadas avaliações sobre o comportamento meiótico e viabilidade polínica de acessos dessa espécie. O conhecimento dessas características permite obter informações sobre o material genético, ajudando no fornecimento de métodos para manipulá-lo, sendo, dessa forma, uma ferramenta eficiente para o melhoramento e evolução de plantas (SYBENGA, 1998).

Nos 12 acessos de *S. australis* analisados, o comportamento meiótico foi considerado regular durante a meiose I e II, apesar de algumas irregularidades terem sido encontradas. A partir da observação das células em diacinese, foi possível determinar a presença de 19 cromossomos em bivalentes, ou seja, o número gamético (n) = 19, sugerindo número somático $2n$ = 38. Foi encontrado, na literatura, apenas um único relato sobre contagem cromossômica para *S. australis*, onde o número somático foi de $2n$ = 37 (GOLDBLATT, 1996), diferindo do que foi sugerido no presente trabalho. Entretanto, para outras espécies do gênero *Sambucus* L., como *S. caerulea* Raf., *S. callicarpa* Greene, *S. melanocarpa* A. Gray e *S. sachalinensis* Pojark., o número somático $2n$ = 38 foi confirmado (GOLDBLATT, 1996).

Através do presente estudo, foi possível realizar pela primeira vez a determinação do número de cromossomos através de células gaméticas de *S. australis* em acessos do Rio Grande do Sul (RS). Olkoski et al. (2008) também utilizaram células gaméticas para determinar o número de cromossomos de três espécies medicinais nativas do Rio Grande do Sul. Os autores encontraram n = 10 para *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron. e n = 9 para *Pterocaulon polystachyum* DC. e *Solidago microglossa* DC., sugerindo números somáticos $2n$ = 20 e $2n$ = 18, respectivamente.

O índice meiótico apresentou-se alto, com variação entre os acessos de 91,1 a 100%. Plantas com índice meiótico superior a 90% são consideradas estáveis citologicamente e, portanto, podem fazer parte tanto de programas de melhoramento genético quanto nos de

preservação da espécie (LOVE, 1949). Outras espécies apresentaram valores de índice meiótico geralmente superior a 90%, como *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (LUNARDI et al., 2004), linhagens avançadas de pimenta do gênero *Capsicum* L. (POZZOBON et al., 2011) e espécies do gênero *Adesmia* DC. (TEDESCO et al., 2002).

A estimativa da viabilidade polínica de 14 acessos foi realizada utilizando-se três corantes:orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Pela análise dos resultados, pode-se observar que o corante orceína acética 2% foi o que apresentou a maior média de porcentagem de polens viáveis (99,8%), seguido do corante carmim acético 2% (97,5%), enquanto o corante reativo de Alexander foi o que apresentou a menor média de viabilidade polínica (86,4%), diferindo estatisticamente dos outros dois corantes. Assim, o corante reativo de Alexander foi considerado o melhor para estimar a viabilidade polínica neste trabalho, pois permitiu diferenciar com precisão o pólen viável do inviável. Isso pode ser explicado pelo fato do corante reativo de Alexander produzir uma coloração diferencial entre grãos de pólen viáveis e inviáveis (ALEXANDER, 1980), ao passo que os outros dois corantes podem ter superestimado a viabilidade polínica. O mesmo já foi observado por Frescura et al. (2012b), que utilizaram os três corantes do presente trabalho para estimar a viabilidade polínica de 20 acessos de *Polygala paniculata* L.

Quando comparadas as médias de viabilidade polínica entre os acessos, dentro de cada corante, não houve diferenças significativas entre os 14 acessos para os corantes orceína acética 2% e carmim acético 2%. Já para o corante reativo de Alexander, ocorreram diferenças entre os acessos, sendo que o acesso ERE01 (Erechim) diferiu significativamente de todos os demais acessos analisados, enquanto os acessos TUP11 (Tupanciretã), SIL13 (Silveira Martins), ITA16 (Itaara) e CRA17 (Cruz Alta) foram semelhantes estatisticamente entre si, mas diferiram significativamente dos acessos ERE01, SM02 (Santa Maria), SM04, SM05, SM06, CRA07, FOR09 (Formigueiro), TUP10, SIL14 e SIL15. Essas diferenças podem ser explicadas por diversos fatores, como a variabilidade genética, além de causas não genéticas, que incluem o estágio do pólen e fatores físicos como temperatura e umidade (KELLY et al., 2002).

CONCLUSÃO

Os extratos aquosos das inflorescências e folhas de dois acessos de *S. australis* são antiproliferativos e não genotóxicos sobre o ciclo celular de *A. cepa*.

Os extratos das folhas de *S. australis* na concentração de 12g.L⁻¹, em ambos acessos de Santa Maria e Erechim, possuem atividade antigenotóxica, diminuindo os danos cromossômicos causados pelo glifosato.

Os extratos apresentam os compostos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e canferol, sendo o canferol e o ácido clorogênico os compostos majoritários nos extratos das inflorescências e folhas, respectivamente.

Os acessos de *S. australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, número gamético (n) = 19, índice meiótico superior a 90% e alta viabilidade polínica, sendo o corante reativo de Alexander o mais eficiente para estimar a viabilidade polínica nessa espécie.

REFERÊNCIAS

- ALAERTS, G. et al. 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 bacteria. **Stain Technology**, v. 55, p. 13-18, 1980.
- ALICE, C. B. et al. Diagnose comparativa de compostos polifenólicos de *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 4, p. 88-90, 1990.
- APG II – The Angiosperm Phylogeny Group. An Update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot J Linn Soc**, v. 441, p. 399-436, 2003.
- ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, M.; RAVEN, P. H. (Eds) **Advances in legumes systematics**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 723-769.
- 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 Mediciniais**, v. 8, p. 55-63, 2006.
- BACIGALUPO, N. M. Caprifoliaceae. In: BURKART, A. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Buenos Aires: INTA, v. 6, 1974. p. 50-52.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.
- BAGATINI, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 632-636, 2009.
- 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.

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

CORDELL, J.L. A guide to developing clinical pathways. **MLO: medical laboratory observer**, v. 27, n. 4, p. 35-39, 1995.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York, Columbia Univ. Press. 1981, 1262p.

CRUZ, G. L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1979. 599 p.

DIAS, M. G. et al. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230 p.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 241-249, 2007.

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, p. 110-116, 2009.

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

FRESCURA, V. D. **Análise do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 2012. 73f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

FRESCURA, V. D. S.; LAUGHINGHOUSE IV, D. H.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. **Caryologia**, v. 65, n. 1, p. 27-33, 2012a.

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

GOLDBLATT, P. **Index to Plant Chromosome Numbers**, 1992-1993. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v. 58, p. 1-276. 1996.

GUARRERA, P. M.; FORTI, G.; MARIGNOLI, S. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 429-444, 2005.

GUINET, P. H. **Advances in legume biology**: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842 p.

HOLLMAN, P. C. H.; VAN TRIP, J. M. P.; BUYSMAN, M. N. C. P. Fluorescence detection of flavonols in HPLC by post-column chelation with aluminium. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3511-3515, 1996.

JORGE, L. I. F. et al. Identificação histológica de *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. (Sabugueiro). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 20, p. 117-123, 1999.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1021-1023, 2002.

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

KUHN, A. W. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia**, DOI: 10.1080/00087114.2014.998525.

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.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas, Instituto Plantarum, São Paulo, 2002. 512p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544 p.

LOVE, E. M. La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina Agronomia**, v. 16, p. 1-13, 1949.

LUNARDI, M. P. M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BARROS, I. B. I. Chromosome number variability in the south american medicinal plant *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (Celastraceae). **Cytologia**, v. 69, p. 439-45, 2004.

NEVES, E. S. B. et al . Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1131-1137, 2014 .

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

OLKOSKI, D. et al. Meiotic analysis of the germoplasm of three medicinal species from Asteraceae family. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1777-1780, 2008.

OYAMA, K. Conservation biology of tropical trees: demographic and genetic considerations. **Environment update**, v. 1, p. 17-32, 1993.

PELZER, L. E. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

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, p. 678-681, 2006.

PINHO, D. S. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 165-170, 2010.

POZZOBON, M. T. et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 212-216, 2011.

REITZ, R. Caprifoliáceas. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí. Fasc., 1985. 16 p.

SCOPEL, M.; **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** 2005. 263p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2005.

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, L. F. B. 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.

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.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding a personal view. In: LELLEY, T. **Current Topics in plant cytogenetics related to plant improvement.** Viena: Universitäts Verlag, 1998. p. 22-33.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

TEDESCO, S. B.; SCHIFFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Meiotic behavior and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (Leguminosae). **Caryologia**, v. 55, n. 4, p. 341-347. 2002.

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.

ANEXOS

Anexo A – Aspecto de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. do município de Santa Maria, RS.



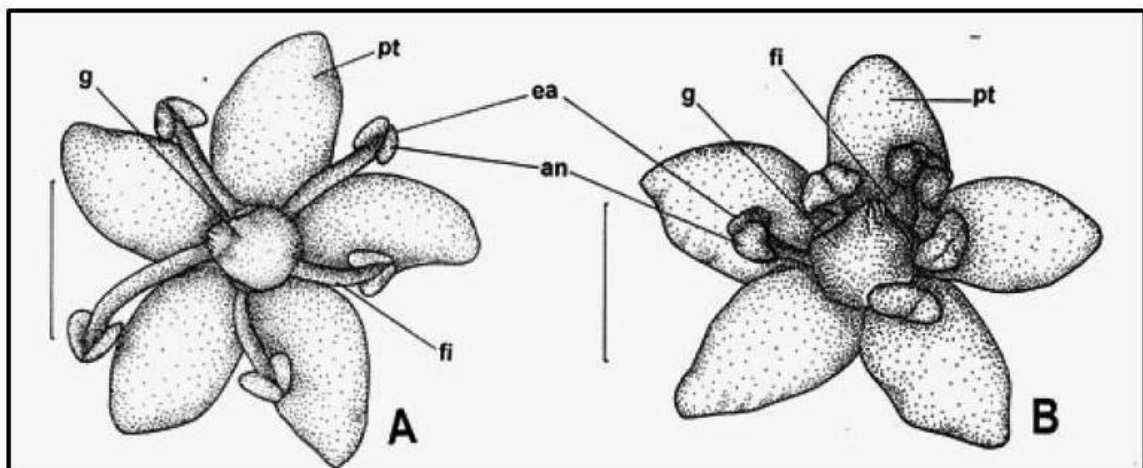
Anexo B – Aspecto de folhas e inflorescências de *Sambucus australis* Cham. & Schltld. do município de Santa Maria, RS.



Anexo C – Aspecto de inflorescências com flores de estames de filetes curtos (pistiladas – seta A) e longos (estaminadas – seta B) de *Sambucus australis* Cham. & Schldtl. do município de Santa Maria, RS.



Anexo D – Desenho esquemático de flores (vista frontal) A) estaminadas e B) pistiladas de *Sambucus australis* Cham. & Schldtl.



Fonte da figura: SCOPEL, M. (2005). Legenda: an – antera; ea – estame; fi – filete; g – gineceu; pt – pétala. Escala: 2,5 mm.