



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL – UFERSA/UFRN

**ESTUDO ALELOPÁTICO, FITOQUÍMICO E GENOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma pyrifolium* MART.
E *Combretum leprosum* MART. EM *Allium cepa***

JOSÉ CARLOS DA SILVEIRA PEREIRA

MOSSORÓ/RN – BRASIL
Agosto/2015

JOSÉ CARLOS DA SILVEIRA PEREIRA

**ESTUDO ALELOPÁTICO, FITOQUÍMICO E GENOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma pyrifolium* MART.
E *Combretum leprosum* MART. EM *Allium cepa***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa

MOSSORÓ/RN – BRASIL
Agosto/2015

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

Pereira, José Carlos da Silveira.

Estudo alelopático, fitoquímico e genotóxico de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. e *Combretum leprosum* Mart. em *Allium cepa* / José Carlos da Silveira Pereira. - Mossoró, 2015.

67f: il.

1. Plantas tóxicas. 2. Genotoxicidade. 3. Pereiro. 4. Mufumbo. 5. Caatinga - perfil bioquímico de plantas. I. Título

RN/UFERSA/BOT/936

CDD 581.69 P436E


JOSÉ CARLOS DA SILVEIRA PEREIRA

**ESTUDO ALELOPÁTICO, FITOQUÍMICO E GENOTÓXICO
DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma pyrifolium* MART.
E *Combretum leprosum* MART. EM *Allium cepa***

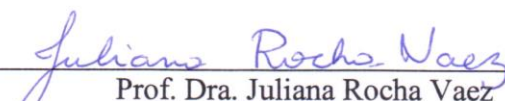
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM: 27 / 08 / 15

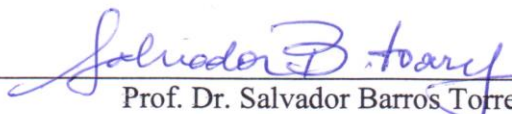
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa
Presidente – Orientador – PPGPA/UFERSA



Prof. Dra. Juliana Rocha Vaez
Primeiro Membro – Externo – DACS/UFERSA



Prof. Dr. Salvador Barro Torres
Segundo Membro – Externo – DCV/UFERSA

A Ana Monteiro de Jesus (in memoriam),
minha avó, minha mãe em muitos momentos,
para sempre minha fonte de inspiração,
orgulho e fortaleza.

A Francisca Monteiro da Silveira, minha mãe,
minha amiga, conselheira, que sempre apoiou
os meus sonhos e que é o motivo de eu ter
chegado até aqui. Amo você.

“Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento, não há liberdade sem sacrifício”
J. R. R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

A Deus por jamais ter me desamparado e por me fazer compreender que todas as coisas que possuo são efêmeras, exceto os meus sentimentos e o aprendizado ao qual me permito, que nada carrego além de minha idéias e que não há nada sob meus pés, a não ser o chão que suporta todos nós igualmente.

Aos meus pais, Francisca Monteiro e João Maria, por ensinarem os verdadeiros valores da vida e por em todos os momentos estarem contribuindo, incentivando e lutando em cada fase de minha vida.

À minha família, por ser símbolo de união e companheirismo em todos os momentos de minha vida e pela compreensão nos momentos especiais de nossas vidas em que estive ausente. Em especial, à minha tia Francineide (minha segunda mãe) pelo verdadeiro sentimento de amor, dedicação e constante apoio. Amo-os.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa, por ter me acolhido nesse mestrado, por sua paciência, incentivo e conselhos, que só vieram acrescentar a este trabalho, além de sua dedicação e por toda competência.

À Prof. Dra. Juliana Rocha Vaez e ao Prof. Dr. Salvador Barros Torres, por suas imensas colaborações no projeto e em minha formação profissional e pessoal.

À Prof. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva e Prof. Dra. Patricia Ligia Dantas de Moraes, por toda ajuda e cooperação neste trabalho.

Aos meus amigos Camila, Edigleyce, Naama e Eliezer, companheiros de longa data, estiveram comigo para que esse trabalho fosse realizado. Amigos além das paredes da universidade, amigos para a vida toda. Agradeço a vocês por tudo.

À Lorena, querida amiga, companheira nos momentos alegres e principalmente nos mais difíceis. Compartilhamos conselhos e opiniões, as quais nos mantiveram firmes nessa jornada árdua de aprendizado. Boas lembranças, amizade para a vida!!

À Maressa, pelas conversas agradabilíssimas intermináveis, pelos cafés quase deliciosos, por sua doçura e amizade. Rimos muito juntos, espero podermos compartilhar novos momentos.

Aos queridos amigos do LAGENE, LABCEMOL e LABHAV, em especial a Beatriz, Gillianne, Gilson, Jannini, Karina, Larissa, Lucia, Luciano, Paulo, Pedro, Raul, Tatiana e Valéria pela amizade compartilhada, obrigado por toda ajuda.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, bem como seus professores, por ter me concedido espaço e subsídios para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta, permitindo-me chegar à conclusão do mestrado.

Obrigado!

ESTUDO ALELOPÁTICO, FITOQUÍMICO E GENOTÓXICO DE EXTRATOS
AQUOSOS DE *Aspidosperma pyriforme* MART. E *Combretum leprosum* MART. EM
Allium cepa

Pereira, José Carlos da Silveira. Estudo alelopático, fitoquímico e genotóxico de extratos aquosos de *Aspidosperma pyriforme* Mart. e *Combretum leprosum* Mart. em *Allium cepa*. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2015.

RESUMO - A Caatinga apresenta grande diversidade vegetal, mas poucas espécies nativas possuem estudos fitoquímicos, alelopáticos e genotóxico. *Aspidosperma pyriforme* e *Combretum leprosum* são exemplos de plantas de grande importância etnofarmacológica que carecem de estudos toxicológicos. O objetivo foi avaliar a influência alelopática, citotoxicidade e genotoxicidade de extratos aquosos de *A. pyriforme* e *C. leprosum* sobre a germinação e desenvolvimento inicial de sementes comerciais de *Allium cepa* L. (organismo-teste) e descrever seus perfis fitoquímicos. 50 sementes de *A. cepa* foram colocadas na presença dos extratos aquosos dessas plantas nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/L, com quatro réplicas cada, sendo avaliadas as seguintes variáveis: germinação, velocidade de germinação, comprimento e matéria seca de raízes, hipocótilo e plântula, densidade de biomassa de plântula e índice mitótico. Foram realizados testes qualitativos e quantitativos em diversas classes de metabólitos para a descrição do perfil fitoquímico. Os resultados dos grupos dos extratos não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo, quanto às características germinativas, indicando que os extratos não possuem efeito alelopático. No entanto, pelo índice mitótico foi identificada citotoxicidade subletal do extrato aquoso de *C. leprosum*, com 200 mg/L. Os perfis fitoquímicos identificaram substâncias inéditas para ambas as espécies. Entretanto, devido a possíveis efeitos sinérgicos dos extratos são necessários mais estudos para melhor caracterização fitoquímica de ambas as espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade. Perfil bioquímico. Genotoxicidade. Pereiro. Mofumbo.

ALLELOPATHIC STUDY, PHYTOCHEMICAL AND GENOTOXIC OF AQUEOUS
EXTRACTS OF *Aspidosperma pyrifolium* MART. AND *Combretum leprosum* MART. IN
Allium cepa

Pereira, José Carlos da Silveira. Allelopathic study, phytochemical and genotoxic of aqueous extracts of *Aspidosperma pyrifolium* Mart. and *Combretum leprosum* Mart. in *Allium cepa*. 2015. 71 f. Dissertation (Master Science Degree in Animal Science: Characterization, Conservation and Genetic Improvement of Local Resources) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2015.

ABSTRACT - The Caatinga has great plant diversity, but few native species have phytochemical, allelopathic and genotoxic studies. *Aspidosperma pyrifolium* and *Combretum leprosum* are examples of plants of great importance ethnopharmacological that lacking of toxicological studies. The objective was to evaluate the allelopathic influence, cytotoxicity and genotoxicity of aqueous extracts of *A. pyrifolium* and *C. leprosum* on germination and early development of commercial seed of *Allium cepa* (indicator organism) and describing their biochemical profiles. 50 seeds of *A. cepa* were placed in the presence of aqueous extracts of these plants in concentrations of 200, 400 and 800 mg/L, with four replicates each, the following variables were evaluated: germination, germination speed, length and dry matter of roots, hypocotyl and seedling, seedling biomass density and mitotic index. Qualitative and quantitative tests were performed on various classes of metabolites to describe the biochemical profile. The results of the extracts groups did not differ from negative control group, for the germination characteristics, indicating that the extracts do not have allelopathic effect. However, the mitotic index was identified sublethal cytotoxicity of aqueous extract of *C. leprosum*, with 200 mg/L. Biochemical profiles identified novel substances for both species. However, due to possible synergistic effects of the extracts more studies are needed to better phytochemical characterization of both species.

Keywords: Toxicity. Biochemical profile. Genotoxicity. Pereiro. Mofumbo.

LISTA DE TABELAS

Considerações Gerais

Tabela 1. Lista de espécies de plantas do nordeste tóxicas para animais de produção. 13

Capítulo I

Tabela 1. Índice de Crescimento Relativo (ICR) e Índice de Germinação (IG) de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*. 42

Tabela 2. Perfil fitoquímico das substâncias presentes no extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*. 43

Capítulo II

Tabela 1. Crescimento vegetal, matéria seca e densidade de biomassa de raízes, hipocótilos e plântulas de sementes de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* e extrato aquoso de *C. leprosum*. 55

Tabela 2. Índice mitótico e valor limite de citotoxicidade de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*. 58

Tabela 3. Dosagem de metabólitos no extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*. 60

LISTA DE FIGURAS

Considerações Gerais

Figura 1. Células meristemáticas de *A. cepa* apresentando MN. A: Interfase Normal; A1: Célula em interfase com MN (setas); B: Prófase normal; B1: Profase com MN; C: Metáfase normal; C1: Metáfase com MN; D: Anáfase normal; D1: Anáfase com MN; E: Telófase normal; E1: Telófase com MN (LEME; MARIN-MORALES, 2009).....22

Figura 1. Percentual das fases do ciclo celular de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* (A) e extrato aquoso de *C. leprosum* (C), nas concentrações 200, 400 e 800 mg/L, controle negativo (CN) e controle positivo (CP).59

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.2.1. Plantas Tóxicas	12
1.2.2. Uso de fitoquímicos.....	14
1.2.3. Ensaio de germinação para avaliação alelopática.....	15
1.2.4. Genotoxicidade	17
1.2.5. Plantas bioindicadoras de genotoxicidade.....	17
1.2.6. Análises de genotoxicidade no teste de <i>Allium cepa</i>	18
1.2.6.1. Índice Mitótico	18
1.2.6.2. Aberrações Cromossômicas	20
1.2.6.3. Anormalidades nucleares.....	20
1.2.6.4. Micronúcleos	21
1.2.7. Efeitos de aloquímicos sobre genotoxicidade	22
1.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
2 CAPÍTULO I – ALELOPATIA E PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRATOS AQUOSOS DE ESPÉCIES DA CAATINGA EM SEMENTES DE CEBOLA	35
1.3.1. INTRODUÇÃO	38
1.3.2. MATERIAL E MÉTODOS	39
1.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
1.3.4. CONCLUSÕES.....	44
1.3.5. REFERÊNCIAS	45
2. CAPÍTULO II – TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE PEREIRO E MOFUMBO COM O TESTE <i>ALLIUM CEPA</i>	49
INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A vegetação xerófila da Caatinga é resultante de fatores climáticos marcantes da região semiárida em associação aos tipos de solo, relevo e rede hidrográfica característicos da região (ANDRADE-LIMA, 1981). As árvores e arbustos deste bioma durante o período chuvoso representam baixo percentual na oferta de forragem, em relação ao extrato herbáceo (PEREIRA FILHO; SILVA; CÉZAR, 2013), uma vez que sua folhagem se encontra fora do alcance dos animais, todavia, com o início da estação seca, a fitomassa disponível é enriquecida com a queda das folhas (ANDRADE et al., 2010).

Segundo Araújo Filho (1992), o potencial de produção de matéria seca da Caatinga aproxima-se de 4000kg/ha/ano, sendo produto da porção forrageira da parte aérea das plantas lenhosas (árvores e arbustos), das folhas e ramos das espécies herbáceas. Essas forragens permitem à exposição dos animais de produção a plantas tóxicas, a qual se dá principalmente por sua presença nas pastagens, contaminação acidental do alimento e/ou oferecimento como alimento (BARBOSA et al., 2007).

Existem no Brasil diversas plantas que causam intoxicações quando ingeridas por animais (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002; BARBOSA et al., 2007), com muitos registros no Nordeste (RIET-CORREA; BEZERRA; MEDEIROS, 2011).

Os responsáveis pela intoxicação das plantas são, na maioria dos casos, os metabólitos secundários (ANDRADE; MATTOS, 1968; CHEEKE, 1998; PARSONS; WILLIAMS, 2000; TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002; AJASA et al., 2004; HAIDER et al., 2004; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014). Dentre estes metabólitos, as classes químicas mais importantes são: alcaloides, glicosídeos, lecitinas e ácidos orgânicos. Além de outros compostos como minerais (absorvidos do solo e acumulados na planta), como por exemplo, selênio, bário, nitratos e oxalatos (ANDRADE; MATTOS, 1968; CHEEKE, 1998).

Com o consumo das plantas também podem ocorrer perdas diretas (morte, perda de peso ou redução do crescimento, perdas reprodutivas causadas por abortos, infertilidade e malformações) ou indiretas, como os custos para a recuperação ou reposição dos animais (JAMES; NIELSEN; PANTER, 1992). Existem ainda, registros de plantas responsáveis por causar citotoxicidade e genotoxicidade (AKINBORO; BAKARE 2007; SILVA et al., 2011) podendo resultar em morte celular (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008), a partir

de que, os agentes citotóxicos podem induzir uma fase inicial de apoptose, a qual evolui para necrose (ARALDI et al., 2015).

Nesse âmbito, objetivou-se avaliar a influência alelopática, citotoxicidade e genotoxicidade de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* MART. e *Combretum leprosum* MART sobre a germinação e desenvolvimento inicial de sementes comerciais de *Allium cepa* (organismo-teste).

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Plantas Tóxicas

No Nordeste, o efetivo de rebanhos (cabeças) de bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos é 28.958.676, 126.209, 8.023.070 e 9.774.436, respectivamente (IBGE, 2013a). Oito estados da região nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Piauí) e o norte de Minas Gerais pertencem ao semiárido (IBGE, 2013b). O sistema de criação predominante nesta região é extensivo, onde o próprio animal colhe seu alimento diretamente no campo. As pastagens são o principal alimento para os rebanhos, predominando áreas de pastagem nativa em relação às de pastagens cultivadas em todos os estados, exceto no norte de Minas Gerais (GIULIETTI et al., 2003).

Mendes (1997) afirma que:

“Nas secas, não ocorre à formação de pastagens rasteiras anuais, em quantidade suficiente, de modo que as ramas das forrageiras arbóreas e arbustivas, como o juazeiro, mororó, canafistula, juazeiro, catingueira, sabiá, jurema-preta, jurema-branca, catanduva, turco e muitas outras forrageiras, constituem em o único pasto disponível [...]”

A Caatinga é rica em espécies lenhosas e herbáceas, sendo as primeiras caducifólias e as últimas anuais, em sua maioria. A forragem produzida pelas espécies arbóreas, dentre as quais a maioria é leguminosa, é subaproveitada por parte dos animais, pois quando verde, encontra-se indisponível ao consumo por estar na copa das árvores e só é consumida quando as folhas entram em senescência (COSTA et al., 2011). Em contrapartida, as espécies arbustivas podem ser consumidas ainda verdes, pois estão ao alcance dos animais (SANTOS et al., 2010; COSTA et al., 2011).

Nesse contexto, planta tóxica de interesse pecuário é aquela que, quando ingerida pelos animais de interesse zootécnico, sob condições naturais, causa danos à saúde e pode ser letal (TOKARNIA; DÕBEREINER; PEIXOTO, 2000). No nordeste brasileiro já foram identificadas várias espécies de plantas tóxicas para animais de interesse zootécnico (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de espécies de plantas do nordeste tóxicas para animais de produção.

Nome Científico	Nome Popular	Toxidez	Referência
<i>Anacardium</i> spp.	Caju	Distúrbios neurológicos	1
<i>Aspidosperma pyrifolium</i>	Pereiro	Distúrbios reprodutivos	3
<i>Ateleia glazioviana</i>	-	Distúrbios cardíacos	2
<i>Arrabidaea bilabiata</i>	-	Distúrbios cardíacos	2
<i>Arrabidaea japurensis</i>	-	Distúrbios cardíacos	2
<i>Arrabidaea coralina</i>	Cipó-de-rêgo	Distúrbios digestivos	3
<i>Brachiaria</i> spp.	Capim braquiária	Hepatotóxica e fotossensibilização	2,3
<i>Brachiaria humidicola</i>	Capim braquiária	Envenenamento com oxalato	2
<i>Brachiaria radicans</i>	Capim braquiária	Anemia hemolítica e envenenamento com nitrato/nitrito	2
<i>Brachiaria decumbens</i>	Capim braquiária	Fotossensibilização	2
<i>Centratherum brachylepis</i>	Perpétua	Distúrbios digestivos	3
<i>Cestrum laevigatum</i>	Coerana, coerana-branca, dama-da-noite, mata-boi	Hepatotóxica	2,3
<i>Copernicia prunifera</i>	Carnaúba	Hepatotóxica	1
<i>Crotalaria retusa</i>	Guizo de cascavel, feijão de guizo, chocalho de cobra, gergelim bravo	Hepatotóxica	1,2
<i>Ditaxis desertorum</i>	Anil verdadeiro, anilera	Anemia hemolítica	1,2,3
<i>Echinochloa polystachya</i>	Capim mandante	Envenenamento com nitrato/nitrito	1
<i>Enterolofium contortisiliquum</i>	Tambor, tamboril, orelha de negro, orelha de macaco, timbaúba	Distúrbios digestivos	1
<i>Floehlichia ulbotiana</i>	Ervanço	Fotossensibilização	1
<i>Indigofera suffruticosa</i>	Anil verdadeiro, anilera	Anemia hemolítica	1,2,3
<i>Ipomoea asarifolia</i>	Salsa	Distúrbios neurológicos	1,2
<i>Ipomoea carnea</i>	Algodão bravo, canudo, mata bode	Distúrbios neurológicos	1,2
<i>Ipomoea riedelii</i>	Anicão	Distúrbios neurológicos	1,3
<i>Ipomoea sericophylla</i>	Jetirana	Distúrbios neurológicos	1,3
<i>Lantana</i> spp.	Chumbinho	Fotossensibilização	1,2
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leucena	Afeta pele e anexos	1,2,3
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca, macaxeira	Cianogênica	1,2,3
<i>Manihot</i> spp.	Maniçobas	Cianogênica	1,2,3
<i>Marsdenia</i> spp.	Mata calado	Distúrbios neurológicos	1
<i>Mascagnia elegans</i>	Tinguí	Distúrbios cardíacos e/ou “morte súbita”	1,2
<i>Mascagnia rígida</i>	Tinguí	Distúrbios cardíacos e/ou “morte súbita”	1,2
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Jurema preta	Distúrbios reprodutivos	1
<i>Nierembergia veitchii</i>	-	Calcinose	2
<i>Paulicorea aeneofusca</i>	-	“morte súbita”	1
<i>Paulicorea marcgravii</i>	Erva de rato	“morte súbita”	1
<i>Pennisetum purpureum</i>	Capim elefante	Envenenamento com nitrato/nitrito	1
<i>Piptadenia marocarpa</i>	Angico	Cianogênica	1,2
<i>Piptadenia viriflora</i>	Angico	Cianogênica	1

<i>Plumbago scandens</i>	Louco	Distúrbios digestivos	1,2,3
<i>Prosopis juliflora</i>	Algaroba	Distúrbios neurológicos	1,2,3
<i>Pteridium aquilinum</i>	Samambaia do campo	Distúrbios neurológicos e ação radiomimética	1,2
<i>Ricinus communis</i>	Mamona, carrapateira	Distúrbios digestivos e neurológicos	1,2
<i>Senecio</i> spp.	Maria mole	Hepatotóxica	2
<i>Sida carpinifolia</i>	-	Distúrbios neurológicos	2
<i>Sorgum vulgare</i>	Sorgo	Cianogênica	1
<i>Stryphnodendron coriaceum</i>	Barbatimão do Nordeste, barbatimão do Piauí	Distúrbios digestivos	1,2,3
<i>Tephrosia cinerea</i>	Anil, falso anil	Hepatotóxica	1,3
<i>Thilao glaucocarpa</i>	Sipaúba, vaqueta	Nefrotóxica	1,2,3
<i>Turbina cordata</i>	Capoteira, batata de peba, moita de calango	Distúrbios neurológicos	3

Referências: 1) Barbosa et al. (2007); 2) Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2002) e 3) Riet-Correa, Bezerra e Medeiros (2011).

1.2.2. Uso de fitoquímicos

Rhoades e Cates (1976) postularam que em plantas existe um maior direcionamento biológico para defesas aparentes e defesas químicas quantitativas, que podem atuar como redutores de digestibilidade (por exemplo, taninos). Entretanto, plantas com defesa não aparentes podem acumular defesas qualitativas (por exemplo, glicosídeos), presentes em baixas concentrações em tecidos e com baixo custo metabólico (PIAZZAMIGLIO, 1991).

Seguindo este princípio, sabe-se que plantas anuais são mais tóxicas do que plantas perenes, e que espécies que colonizam rapidamente e têm um ciclo de vida curto, tendem a investir na qualidade dos compostos de defesa e não sobre a quantidade (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985).

O conhecimento sobre a toxicidade das plantas tóxicas é importante para o homem, pois várias espécies podem ter uso medicinal e espécies forrageiras tóxicas causam prejuízo a produção animal. Um exemplo de espécie que tem princípio ativo aplicado na medicina é *Catharanthus roseus* (boa-noite), uma espécie anual considerada uma erva daninha, que produz vincristina e vinblastina, substâncias muitas vezes utilizadas para a quimioterapia combinada de alguns tipos de câncer, como coriocarcinoma, câncer de pulmão, leucemia aguda e a doença de Hodgkin, juntamente com outras drogas antitumorais (VICI et al., 2002).

Enquanto que existem relatos de intoxicação com outras ervas que afetam a produção animal, como *Ipomea asarifolia* (salsa), a qual atinge em ordem nervosa diferentes animais de produção: em bovinos e ovinos, são observados tremores musculares e desequilíbrio na locomoção com conseqüente queda do animal ao solo e decúbito; já em caprinos observa-se apatia, sonolência, além de tremores musculares e desequilíbrio (CHAVES, 2009). Estes

sintomas são muitas vezes justificados pela presença de fitotoxinas ou micotoxinas (MEDEIROS et al., 2003).

As plantas que se desenvolvem em ambientes rigorosos, como a Caatinga, têm taxas de crescimento mais lentas e tendem a investir em compostos de alto peso molecular, principalmente na produção de compostos bioativos tóxicos (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985; BARONE; COLEY, 2002). Dentre estes, os metabólitos secundários são os principais responsáveis pela toxicidade, garantindo vantagens para a sobrevivência das plantas (SANTOS, 2004). Estes metabólitos são classificados quanto à estrutura química: nitrogenados (alcalóides, aminoácidos não-protéicos e glicosídeos cianogênicos), terpenóides (óleos essenciais, triterpenos, saponinas e glicosídeos cardioativos) e fenólicos (ligninas, flavonóides e taninos) (HARBONE, 1988; SANTOS, 2004; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

Almeida et al., (2005) em um estudo etnobotânico realizado em conjunto com uma abordagem fitoquímica identificou pelo menos uma das cinco classes de compostos avaliadas (fenóis, taninos, alcalóides, triterpenos e quinonas) para cada uma das espécies da Caatinga coletadas nos diferentes estratos (herbáceo, arbustivo e arbóreo). Os fenóis foram encontrados em todas as espécies e os taninos em 56% delas. Na análise de alcalóides, apenas duas espécies apresentaram resultados positivos, *Aspidosperma pyriformium* e *Mimosa tenuiflora*. Triterpenos foram detectados em 46,34% das espécies e 34,14% das espécies apresentaram quinonas.

As observações acima não corroboraram completamente com a hipótese de defesas aparentes associadas a defesas químicas (RHOADES; CATES, 1976; PIAZZAMIGLIO, 1991). Estando de acordo com a hipótese de disponibilidade de recursos bióticos a abióticos que promovam a sobrevivência da planta (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985; BARONE; COLEY, 2002). Assim, arbustos e árvores demonstraram um maior número de ocorrências de compostos, apoiando-se na observação de que plantas da caatinga com um ciclo de vida curto tendem a possuírem um maior investimento para o crescimento, a fim de completar o seu ciclo de vida (ALMEIDA et al., 2005).

1.2.3. Ensaio de germinação para avaliação alelopática

Os bioensaios de avaliação do potencial alelopático de metabólitos secundários são principalmente a capacidade de germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas (PAWLOWSKI et al., 2013). As Regras para Análise de Sementes, publicadas pelo Ministério

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, mostram que os bioensaios de germinação de sementes são comumente conduzidos em câmeras de germinação, em condições controladas de temperatura e luz, com duração de tempo variável de acordo com organismo teste empregado. Em determinados casos, a temperatura é contínua e, em outros, alternada com tempo de duração para claro/escuro bem variado, dependendo das exigências da espécie receptora. O volume de água ou outro tratamento também deve ser o ótimo para produzir a turgescência das sementes nas 24 horas subsequentes, para deve ser adicionado um volume de água em quantidade equivalente a 2,0-3,0 vezes o peso do substrato (BRASIL, 2009).

Ao final do período de incubação, contam-se as sementes germinadas e calculam-se, comparativamente ao tratamento controle, visando identificar os efeitos alelopáticos (VARNERO M.; ROJAS A.; ORELLANA R., 2007). Em outros casos, contam-se diariamente as sementes, especialmente quando se tem interesse em determinar o índice de velocidade de germinação (IKEDA et al. 2008). Nesses procedimentos, são consideradas sementes germinadas aquelas que apresentarem radícula com no mínimo 50% do tamanho da semente (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Os valores mais elevados de velocidade de germinação acumulada expressam maior vigor das plântulas em relação a uma outra amostra (RANAL; SANTANA, 2006). Em situações que ocorrem redução nesse vigor pode causar perda progressiva da capacidade produtiva e uma redução na uniformidade da germinação (PAWLOWSKI et al., 2013).

Os procedimentos descritos na literatura para os bioensaios de alongamento da radícula e do hipocótilo são muito semelhantes aos descritos para a germinação de sementes, em relação à temperatura e ao tempo de exposição à luz (PEREIRA et al., 2009). No entanto as raízes, normalmente, são mais sensíveis aos efeitos alelopáticos do que a germinação e o alongamento do hipocótilo (CHON et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2004).

O tempo de duração dos bioensaios é variado, existindo um padrão para primeira e segunda contagem para cada espécie (BRASIL, 2009). Em determinados casos, a avaliação é realizada medindo-se o comprimento da radícula e do hipocótilo; em outros, a avaliação é feita obtendo-se o peso seco (PEREIRA et al., 2009).

De modo geral, a atividade biológica de uma dada mistura de aleloquímicos pode ser atribuída a concentração de cada componente da mistura, mas também pela interação entre eles (sinergismo) (HAIG, 2008). Os taninos, flavonoides e terpenos são exemplos de substâncias que podem ter ação alelopática (HAIG, 2008; RAWAT et al., 1998). Estes últimos tipicamente suprimem a germinação de sementes e causam injúrias as plântulas em

desenvolvimento (SINGH; BATISH; KOHLI, 2002; VOKOU et al., 2003; ZHAO et al., 2009).

1.2.4. Genotoxicidade

A genética toxicológica visa identificar e analisar as interações de substâncias químicas sobre o material genético dos organismos, que promovem alterações significativas nos sistemas biológicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Para tanto podem ser utilizados várias análises genéticas, dentre os principais testes utilizados para detecção de potencial mutagênico de agentes químicos estão o teste de mutação reversa em *Salmonella* (Teste de Ames), que detecta mutações pontuais no genoma bacteriano; e os testes citogenéticos *in vitro* ou *in vivo* em células animais ou vegetais que detectam aberrações cromossômicas (AC) estruturais e/ou numéricas, microscopicamente visíveis, mas de viabilidade desconhecida, com no mínimo, 10 milhões de pares de bases (10Mb) (LIMA; RIBEIRO, 2003).

Outros ensaios que podem detectar grandes alterações cromossômicas e aneuploidias (alteração do número de pares de cromossomos) ou mutações pontuais, com auxílio de bandeamento identificar pequenas alterações cromossômicas e mutações multi-locus (LIMA; RIBEIRO, 2003). Uma das consequências da exposição a agentes genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas, importante bioindicador de exposição a esses mutágenos, cuja uma das consequências é a ocorrência de aneuploidias, que pode levar a formação de micronúcleos (MN) (FENECH, 2000).

1.2.5. Plantas bioindicadoras de genotoxicidade

Bioensaios de mutagenicidade em plantas veem sendo realizados há muitos anos. Levan (1938) propôs o primeiro teste em *Allium cepa*. Atualmente, bioensaios vegetais são sistemas bem estabelecidos e utilizados para análise e monitoramento da genotoxicidade de substâncias (MESI; KOPLIKU, 2013; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014).

Algumas espécies de plantas têm sido citadas por possuírem efeito alelopático sobre o crescimento em ensaios vegetais utilizando organismos bioindicadores como *Allium cepa* L. (SILVA et al., 2013; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014), *Lactuca sativa* L. (PAWLOWSKI et al., 2012; PAWLOWSKI et al., 2013) ou com plantas infestantes de cultura como *Amaranthus tricolor* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., *Euphorbia heterophylla* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell, *Phaseolus lathyroides* L.

(CHAROENYING; TEERARAK; LAOSINWATTANA, 2010; MATSUMOTO et al., 2010; TEERARAK; LAOSINWATTANA; CHAROENYING, 2010).

A espécie bioindicadora *Allium cepa* tem sido muito utilizada em estudos dos efeitos de extratos vegetais visando detectar genotoxicidade (AKINBORO; BAKARE, 2007; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2013; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014). Este teste tem obtido reconhecimento científico por várias instituições, como o Programa Internacional de Segurança Química (International Program on Chemical Safety - IPCS), Programa Ambiental das Nações Unidas (United Nations Environment Program - UNEP), Organização Internacional do Trabalho e Organização Mundial da Saúde (OMS), os quais validam este método de avaliação utilizando raízes de *Allium cepa* (GRANT; SALAMONE, 1994; GOPALAN, 1999). Além disso, o protocolo para análise de micronúcleo também já foi padronizado por meio de um consórcio internacional entre empresas farmacêuticas europeias: F. Hoffmann-La Roche Ltd., Novartis Ltd., Rhone-Poulenc Rorer and Biologie Servier (MILLER et al., 1997).

Esse sistema teste também tem importância no monitoramento da poluição ambiental (metais, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, corantes indústria têxtil, por exemplo) (LEME; MARIN-MORALES, 2009) e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (MESI; KOPLIKU, 2013; MOHAMMED et al., 2015).

Para Fiskesjö (1985), o organismo-teste *A. cepa* possui praticamente a mesma sensibilidade para análises de genotoxicidade que a observada para algas e ensaios com linfócitos humanos. Rank e Nielsen (1994) demonstraram uma correlação de 82% do teste de *A. cepa* com o ensaio de carcinogenicidade em roedores. Outros efeitos genéticos também já foram observados, como: mutagenicidade (AKINBORO; BAKARE 2007; SILVA et al., 2011; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014), anti-mutagenicidade (SILVA et al., 2013), bem como aumento e diminuição da proliferação celular em pontas de raízes tratadas com extratos de diferentes espécies de plantas (AKINBORO; BAKARE 2007; SILVA et al., 2011; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014).

1.2.6. Análises de genotoxicidade no teste de *Allium cepa*

1.2.6.1. Índice Mitótico

O índice mitótico (IM), caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular, tem sido usado como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade (LEME; MARIN-

MORALES, 2009). Os níveis de citotoxicidade podem ser determinados pelo aumento do IM (AKINBORO; BAKARE 2007; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014), podendo ser prejudicial para as células, conduzindo a uma proliferação celular desordenada e mesmo a formação de tecidos tumorais (LEME; MARIN-MORALES, 2009), ou pela diminuição no IM (AKINBORO; BAKARE 2007; SILVA et al., 2013), podendo indicar alterações decorrentes da ação química no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os compostos aneugênicos são compostos que interferem na mitose e embora não necessariamente afetem o DNA diretamente, inibem a formação e função do fuso mitótico e desordenam as segregações cromossômicas. Logo, a aplicação de uma substância com potencial aneugênico em concentração elevada pode interromper totalmente a divisão celular (GRANT, 1978).

A redução do IM pode ser atribuída a inibição da síntese de DNA, explicada pelo bloqueio da fase G1 (SCHNEIDERMAN et al., 1971) ou bloqueio em G2, prevenindo da célula entrar em mitose (VAN'T HOF, 1968), ou ainda, pelo bloqueio da síntese de nucleoproteínas (MERCYKUTTY; STEPHEN, 1980).

Segundo Kirsch-Volders (1984), substâncias com esses efeitos são menos documentadas do que mutágenos que interagem diretamente com o DNA. No entanto, sabe-se que para a maioria dos químicos, o efeito na divisão celular é similar ao promovido pela colchicina: demecolcina, alcaloides, podofilotoxina, compostos orgânicos de arilo e derivados de benzimidazóis que promovem a destruição dos microtúbulos do ciclo celular. Assim como a colchicina, os metais (e.g. chumbo, zinco, organomercuriais) podem inibir a síntese de microtúbulos e/ou destruir microtúbulos pré-formados, bem como agir sobre enzimas necessárias para um processo normal de divisão celular.

Todos estes fatores podem interferir no ciclo celular, assim como também já foi observado que existe uma correlação linear entre os parâmetros macroscópicos e microscópicos, investigados em *Allium cepa*, de modo que, com a redução do crescimento de raízes, também ocorre redução do número de células em divisão, ou seja, do índice mitótico (FISKESJÖ, 1985).

Esta redução ocorre no meristema apical, podendo ser observado em associação com o aparecimento de raízes atrofiadas, indicando atraso no crescimento e citotoxicidade (YILDIZ et al., 2009). Esta inibição do crescimento da raiz em *Allium cepa* também pode ser devido à presença de alguns metais pesados nos extratos, assim como os obtidos de *Azadirachta*

indica, *Mangifera indica*, *Cymbopogon citratus* e *Morinda lucida* (AJASA et al., 2004; HAIDER et al., 2004).

1.2.6.2. Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas (AC) são caracterizadas por mudanças em qualquer estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, sendo causados por agentes clastogênicos e aneuploidogênicos, respectivamente (ALBERTINI et al., 2000).

AC estruturais podem ser induzidas por vários fatores, tais como quebras ou trocas de material cromossômico, inibição da síntese de DNA e danos na replicação do DNA (ALBERTINI et al., 2000; SWIERENGA et al., 1991).

As AC numéricas, por exemplo, aneuploidia e poliploidia, são consequências da segregação anormal de cromossomos, que podem ocorrer espontaneamente ou pela ação de agentes aneugênicos. As células são classificadas como aneuploides quando contêm um pouco a mais (hiperploide) ou um pouco a menos (hipoploide) de cromossomos em relação ao número normal. E são classificadas como poliploides quando contêm múltiplos do número normal de cromossomos (4N, 8N, etc) (ALBERTINI et al., 2000).

A análise de diferentes tipos de aberrações cromossômicas, em todas as fases do ciclo celular, inicialmente proposto por Fiskesjö (1985), permite uma avaliação mais abrangente e precisa quanto a efeitos clastogênicos (CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014) e/ou aneugênicos (AKINBORO; BAKARE, 2007). De um modo geral, pontes e quebras cromossômicas são indicadores de um agente clastogênico, já perdas cromossômicas, atrasos, aderências, multipolaridade e C-metáfases resultam de agentes aneugênicos (ALBERTINI et al., 2000).

1.2.6.3. Anormalidades nucleares

As anormalidades nucleares (AN) são caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, muitas vezes, na forma de núcleos lobulados, brotos nucleares, células polinucleares e minicélulas (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Núcleos lobulados e células polinucleares são resultantes de AC, como uma consequência de anáfases multipolares, que estão associados ou não com aderências cromossômicas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). A presença

daqueles, de acordo com Leme, Angelis e Marin-Morales (2008) pode indicar um processo de morte celular, uma vez que essas anormalidades não são observadas em células F1 de raízes de *A. cepa*.

Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) demonstraram que brotos nucleares podem surgir como uma consequência da eliminação de material genético excedente derivado do processo de poliploidização e, conseqüentemente, também podem ser relacionados com a formação de micronúcleos, o qual pode ainda ser eliminado a partir do citoplasma como uma minicélula.

1.2.6.4. Micronúcleos

Os micronúcleos (MN) têm sido considerados por muitos autores como o mais efetivo e simples fator para analisar efeitos mutagênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009), devido ao fato dos MN resultarem de danos nas células parentais, sendo facilmente observados em células filhas (Figura 1) (RIBEIRO, 2003).

Como são derivados dos processos de poliploidização (AN), citados anteriormente, existem dois mecanismos predominantes que conduzem a formação de MN: quebras cromossômicas (clastogênese) e disfunção no processo mitótico (aneugênese) (KRISHNA; HAYASHI, 2000; BONASSI et al., 2006; SAMANTA; DEY, 2012). Portanto, eles podem surgir a partir do desenvolvimento de algumas AC, como por exemplo, quebras e perdas cromossômicas, que não são integradas ao núcleo da célula filha (FENECH; MORLEY, 1985; FENECH, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

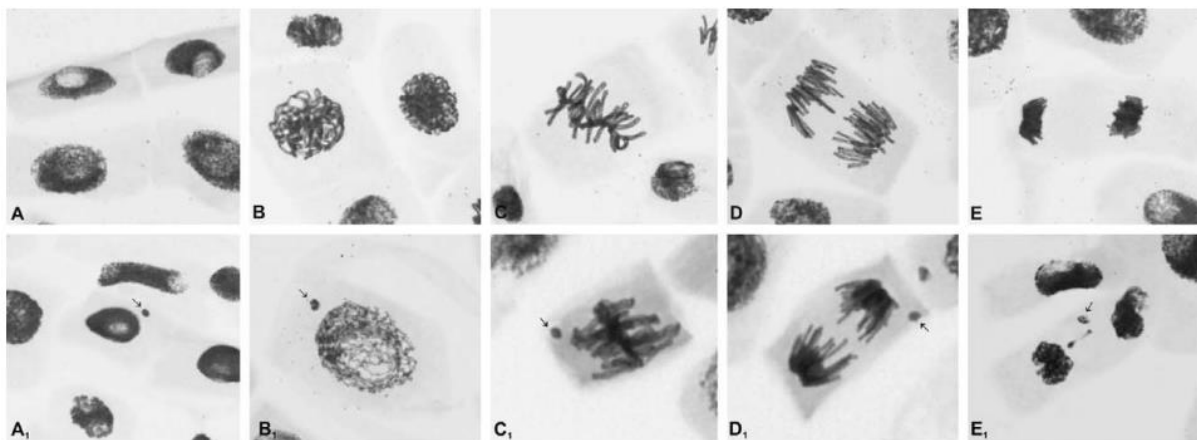


Figura 1. Células meristemáticas de *A. cepa* apresentando MN. A: Interfase Normal; A1: Célula em interfase com MN (setas); B: Prófase normal; B1: Profase com MN; C: Metáfase normal; C1: Metáfase com MN; D: Anáfase normal; D1: Anáfase com MN; E: Telófase normal; E1: Telófase com MN (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As alterações no fuso mitótico na célula de *Allium cepa* podem levar a aneuploidias e a formação de micronúcleos na próxima fase de divisão celular, o que, geralmente, é resultante da separação irregular de cromossomos em anáfase. Os cromossomos podem ser perdidos (CIMINI et al., 2002; AKINBORO; BAKARE, 2007) ou formar uma membrana nuclear em torno de si durante a telófase, formando os micronúcleos (FENECH, 2000) e podem ser visualizados no citoplasma (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Os MN também podem resultar de cromossomos duplo-minutos (DM), formados pela amplificação do DNA em processos oncogênicos (SHIMIZU; SHIMURA; TANAKA, 2000; SAMANTA; DEY, 2012). A remoção do DM do núcleo da célula está associada a perda de uma porção alélica, formando MN, e contribuindo para a carcinogênese (BONASSI et al., 2006).

De modo geral, os agentes genotóxicos podem induzir danos ao DNA durante as fases G₀ a S do ciclo celular, que pode induzir a apoptose, resultando em corpos apoptóticos, durante a apoptose tardia, ou gerar danos cromossômicos, resultando na formação de MN (por quebras e/ou disfunções no processo mitótico), os quais também podem ser destinados a apoptose (ARALDI et al., 2015).

1.2.7. Efeitos de aleloquímicos sobre genotoxicidade

As fitotoxinas (ou aleloquímicos) são compostos químicos com impacto negativo sobre o processo bioquímico, crescimento, comportamento seletivo ou consumo pelos herbívoros (LAUNCHBAUGH, 1996). Cumarinas e flavonoides tem sido atribuído a processos anti-proliferativos (KOSTOVA, 2006; BEN AMMAR et al., 2008). Antioxidantes são conhecidos por serem agentes anti-mutagênicos universais (ODIN, 1997; SARKAR et al., 1997; GIRI; KHYNRIAM; PRASAD, 1998), tem como comuns representantes o ácido ascórbico (vitamina C) e β -caroteno, mas também taninos, saponinas, flavonoides, fenóis e terpenóides (ANANTHI et al., 2010).

Terpenos também estão envolvidos em uma variedade de interações ecológicas, incluindo a alelopatia (DING et al., 2010). As sesquiterpenolactonas potencialmente podem inibir a síntese de DNA, prejudicando a divisão celular normal, observado com a redução do

índice mitótico em células de *Allium cepa* tratadas com extrato aquoso de *Distephanus angulifolius*, o qual apresenta substâncias pertencentes a classe (CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014).

Os taninos (KAUR; GROVER; KUMAR, 2000), as auronas (ZAMPINI et al., 2008; KAUR et al., 2009), os flavonoides (ZHAI et al., 1998; PEREZ-CARREON et al., 2002) e as saponinas (LEE et al., 1999) possuem efeitos antimutagênicos, e foram encontrados no extrato aquoso de *Erythrina velutina*, que apresentou efeito antígenotóxico em *Allium cepa* (SILVA et al., 2013).

Em contrapartida, Chukwujekwu e van Staden (2014) sugeriram que a inibição do crescimento da raiz de *Allium cepa* pelo extrato aquoso de *Distephanus angulifolius* pode ser devido a presença de lactonas sesquiterpênicas, que podem inibir a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), interferindo na divisão celular normal. De forma similar, os alcalóides presentes em *Erythrina* spp. inibem a síntese de DNA e proteínas (PARSONS; WILLIAMS, 2000).

A inibição do crescimento da raiz em *Allium cepa* também pode ocorrer devido à presença de alguns metais pesados nos extratos, assim como os obtidos de *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*, *Cymbopogon citratus* e *Morinda lucida*, as quais apresentam zinco, cobre, manganês, ferro, cádmio e chumbo em diferentes concentrações (AJASA et al., 2004; HAIDER et al., 2004).

1.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJASA, A. M. O. et al. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 67–71, 2004.

AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 470–475, 2007.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 463, n. 2, p. 111–172, 2000.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127–142, 2005.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, 1995.

ANANTHI, R. et al. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 558–560, 2010.

ANDRADE, A. P. et al. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 4, n. 4, p. 1-14, 2010.

ANDRADE, S. O.; MATTOS, J. R. **Contribuição do estudo de plantas tóxicas no estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Biológico, 1968. 101 p.

ANDRADE-LIMA, D. The caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 149-153, 1981.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.

ARAÚJO FILHO, J. A. **Manipulação da vegetação lenhosa da caatinga para fins pastoris**. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, 1992. 18 p. (EMBRAPA-CNPC. Circular Técnica 11).

BARBOSA, R. R. et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2007.

BARONE, J. A.; COLEY, P. D. Herbivorismo y las defensas de las plantas In. GUARIGUATA, M. R.; KATTAN, G. H. (Eds.). **Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales**. 1. ed. Costa Rica: Libro Universitario Regional, 2002. p. 465–492.

BEN AMMAR, R. et al. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 61–80, 2008.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, Mapa/ACS, p. 1-399, 2009.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722–725, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. p. 519-535.

CHAROENYING, P.; TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 411–416, 2010.

CHAVES, D. P. **Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos**. 2009. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants**. 2. ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479 p.

CHON, S. U. et al. Effects of alfafa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. **Crop protection**, v. 21, n. 10, p. 1077-1082, 2002.

CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN STADEN, J. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 147–150, 2014.

CIMINI, D. et al. Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 3, p. 507–515, 2002.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 895–899, 1985.

COSTA, M. R. G. F. et al. Utilização do feno de forrageiras lenhosas nativas do Nordeste brasileiro na alimentação de ovinos e caprinos. **PUBVET**, v. 5, n. 7, ed. 154, art. 1035, 2011.

DING, L. et al. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the entkaurene diterpenoid ramosin B. **Journal of Chemical Ecology**. v. 36, n. 5, p. 553–563, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, 1985.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agente - Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (edição especial), p. 175-204, 2000.

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

GIRI, A.; KHYNRIAM, D.; PRASAD, S. B. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 421, n. 2, p. 139–148, 1998.

GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da CAATINGA: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 382 p.

GOPALAN, H. N. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 99–102, 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 37–43, 1978.

GRANT, W. F.; SALAMONE, M. F. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 187–209, 1994.

HAIDER, S. et al. Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 119–127, 2004.

HAIG, T. Allelochemicals in Plants. In: R. S. Zeng; A. U. Mallik; S. M. Luo (Orgs.); **Allelopathy In Sustainable Agriculture and Forestry**. Springer New York. p.63–104, 2008.

HARBONE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1988. 384 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas do censo demográfico 2010**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2013b. 160 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, v. 41, 2013a. 108 p.

IKEDA, F. S. et al. Light and KNO₃ on *Ageratum conyzoides* L. seed germination at constant and alternating temperature. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 193–199, 2008.

JAMES, L. F.; NIELSEN, D. B.; PANTER K. E. Impact of poisonous plants on the livestock industry. **Journal of Range Management**, v. 45, n. 1, p. 3-8, 1992.

KAUR, P. et al. Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza glabra* L. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 680–686, 2009.

KAUR, S. J.; GROVER, I. S.; KUMAR, S. Modulatory effects of a tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 12, p. 1113–1119, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M. (Org.). **Mutagenicity, Carcinogenicity, and Teratogenicity of Industrial Pollutants**. Boston, MA: Springer US, 1984. 336 p.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as antioxidants. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 365–374, 2006.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 155–166, 2000.

LAUNCHBAUGH, K. L. Biochemical aspects of grazing behaviour. In: HOUDGSON, J.; ILLIUS, A. W. **The ecology and management of grazing systems**. Willingford: CAB International, 1996. p.159-184.

LEE, S.-J. et al. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. **Cancer Letters**, v. 144, n. 1, p. 39–43, 1999.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.

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

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471–486, 1938.

LIMA, P. L. A.; RIBEIRO, L. R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (mouse lymphoma assay). In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, EDMUNDO KANAN. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003. p. 113-149.

MATSUMOTO, R. S. et al. Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.

MEDEIROS, R. M. T et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. **Toxicon**. v. 41, n. 7, p. 933-935, 2003.

MENDES, B. V. **Biodiversidade e desenvolvimento sustentável do semi-árido**. Fortaleza: SEMACE, 1997. 108 p.

MERCYKUTTY, V. C.; STEPHEN, J. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the *Allium* Test. **Cytologia**, v. 45, n. 4, p. 769–777, 1980.

MESI, A.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**. v. 8, p. 19–26, 2013.

MILLER, B. et al. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, v. 392, n. 1-2, p. 45–59, 187–208, 1997.

MOHAMMED, K. P. et al. Forskolín: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 29–32, 2015.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of anti-mutagenic action. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 386, n. 1, p. 39–67, 1997.

OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Efeitos alelopáticos de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.(Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, 401-406, 2004.

PARSONS, A. F.; WILLIAMS, D. A. J. Radical cyclisation reactions leading to polycyclics related to the amaryllidaceae and *Erythrina* alkaloids. **Tetrahedron**, v. 56, n. 37, p. 7217–7228, 2000.

PAWLOWSKI, Â. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 198–203, 2013.

PAWLOWSKI, Â. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 198–203, 2013.

PAWLOWSKI, Â. et al. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 96–103, 2012.

PEREIRA FILHO, J. M.; SILVA, A. M. DE A.; CÉZAR, M. F. Manejo da Caatinga para produção de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 1, 2013.

PEREIRA, W. A. et al. Influence of the seed arrangement, number and size of soybean seed on seeling length test. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 113–121, 2009.

PÉREZ-CARREÓN, J. I. et al. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology in vitro**, v. 16, n. 3, p. 253–258, 2002.

PIAZZAMIGLIO, M. A. Ecologia das interações insetos/planta In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Ecologia Nutricional de Insetos e Suas Implicações no Manejo de Pragas** 1. ed., São Paulo: Manole Ltda, 1991. p. 101–129.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process?. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 1, p. 1–11, 2006.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 1, p. 17–24, 1994.

RAWAT, M. S. M. et al. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 26, n. 1, p. 13-23, 1998.

RHOADES, D. F.; CATES, R. G. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry
In: WALLACE J. W.; MANSELL, R. (Eds.), **Biochemical Interactions Between Plants and Insects** 1. ed., New York: Plenum Press, 1976. p. 168–213.

RIBEIRO, L. R.; Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, EDMUNDO KANAN. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003. p. 173-178.

RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T. **Plantas Tóxicas do Nordeste**. Patos, PB: Sociedade Vicente Pallotti Editora, 2011.

SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84–90, 2012.

SANTOS, M. V. F. et al. Potential of Caatinga forage plants in ruminant feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 204–215, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/UFSC, 2004. p. 403-434.

SARKAR, A. et al. Beta-carotene inhibits rat liver chromosomal aberrations and DNA chain break after a single injection of diethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 7, p. 855–861, 1997.

SCHNEIDERMAN, M. H.; DEWEY, W. C.; HIGHFIELD, D. P. Inhibition of DNA synthesis in synchronized Chinese hamster cells treated in G1 with cycloheximide. **Experimental Cell Research**, v. 67, n. 1, p. 147–155, 1971.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 81–90, 2000.

SILVA, D. S. B. S. et al. Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 273–278, 2013.

SILVA, D. S. B. S. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 92–97, 2011.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop protection**, v. 21, n. 4, p. 347-350, 2002.

SWIERENGA, S. H. H. et al. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 246, n. 2, p. 301-322, 1991.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5677–5684, 2010.

TOKARNIA C. H.; DÖBEREINER J.; PEIXOTO P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Helianthus, 2000. 310 p.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635–1660, 2002.

VAN'T HOF, J. The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems. **Experimental Cell Research**, v. 51, n. 1, p. 167-176, 1968.

VARNERO M., M. T.; ROJAS A., C.; ORELLANA R., R. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. **Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal**, v. 7, n. 1, p. 28–37, 2007.

VICI, P. et al. First-line treatment with epirubicin and vinorelbine in metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 11, p. 2689–2694, 2002.

VOKOU, D. et al. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **Journal of chemical ecology**, v. 29, n. 10, p. 2281-2301, 2003.

YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934–938, 2009.

ZAMPINI, I. C. et al. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 2, p. 330–335, 2008.

ZHAI, S. et al. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 10, p. 989–992, 1998.

ZHAO, X. et al. Terpenes from *Eupatorium adenophorum* and their allelopathic effects on *Arabidopsis* seeds germination. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 2, p. 478-482, 2008.

2 CAPÍTULO I – ALELOPATIA E PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRATOS AQUOSOS DE ESPÉCIES DA CAATINGA EM SEMENTES DE CEBOLA

Trabalho submetido a revista:
Revista Ciência Agronômica;
Página eletrônica: <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista>
ISSN 0045-6888

1 **Alelopatia e perfil fitoquímico de extratos aquosos de espécies da caatinga em sementes**
2 **de cebola**

3
4 Allelopathy and phytochemical profile of aqueous extracts from species of caatinga in onion
5 seeds

6
7 **RESUMO** – A Caatinga apresenta grande diversidade vegetal, mas poucas espécies nativas
8 possuem estudos fitoquímicos e alelopáticos. *Aspidosperma pyriforme* Mart. e *Combretum*
9 *leprosum* Mart. são exemplos de plantas de grande importância etnofarmacológica que
10 necessitam de estudos toxicológicos. A finalidade deste trabalho foi avaliar a influência
11 alelopática de extratos aquosos de *A. pyriforme* e *C. leprosum* sobre a germinação e
12 desenvolvimento inicial de sementes comerciais de *Allium cepa* L. (organismo-teste) e
13 descrever seus perfis bioquímicos. Para isso, as sementes de *A. cepa*, variedade NUN 1205
14 F1, foram colocadas para germinar em caixas do tipo *gerbox* tendo como substrato papel mata
15 borrão umedecido com 10 mL dos extratos aquoso nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/L
16 e água destilada (controle negativo) em câmara de germinação a 20 °C e fotoperíodo de 12
17 horas. Foram utilizadas 50 sementes em cada réplica, em quadruplicata, em delineamento
18 estatístico inteiramente casualizado. Foi realizada análise de variância (ANOVA) com $\alpha=0,05$
19 para os dados germinativos e análise fitoquímica qualitativa para descrição das classes de
20 metabólitos presentes nos extratos das espécies estudadas. Não foram encontradas diferenças
21 estatísticas significativas entre os extratos e o controle negativo para os seguintes testes:
22 germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação, índice de crescimento
23 relativo e índice de germinação. Portanto, os extratos aquosos não apresentaram efeito
24 alelopático e nem afetaram o processo germinativo. Entretanto, os perfis fitoquímicos

25 apresentaram substâncias inéditas. Estas informações são importantes porque essas plantas
26 são normalmente utilizadas para fins medicinais e como alimento para animais de produção.

27 **Palavras-chave:** *Aspidosperma pyrifolium*. *Combretum leprosum*. Mofumbo. Pereiro.
28 Metabólitos secundários.

29 **ABSTRACT** – The Caatinga has great plant diversity, but few native species have
30 phytochemical and allelopathic studies. *Aspidosperma pyrifolium* Mart. and *Combretum*
31 *leprosum* Mart. are examples of ethnopharmacological plants of great importance, which
32 require toxicological studies. The purpose of this study was to evaluate the allelopathic effect
33 of aqueous extracts of *A. pyrifolium* and *C. leprosum* on germination and early development
34 of commercial seed of *Allium cepa* L. (indicator organism) and describe their biochemical
35 profiles. For this, the *A. cepa* seeds, variety NUN 1205 F1, were germinated in gerbox-type
36 boxes having as substrate blotter paper with 10 mL of the aqueous extracts in concentrations
37 of 200, 400 and 800 mg/L and distilled water (negative control) in a germination chamber at
38 20 °C and photoperiod of 12 hours. They were used 50 seeds in each replicate, in
39 quadruplicate in a completely randomized experimental design. An analysis of variance
40 (ANOVA) with $\alpha = 0.05$ for germination data and qualitative phytochemical analysis to
41 describe the classes of metabolites present in extracts of the studied species. There were no
42 statistically differences between the extracts and the negative control to the following test:
43 germination, first count, germination speed index, growth rate and relative germination index.
44 Therefore, the aqueous extracts showed no allelopathic effect and not affect the germination
45 process. However, the phytochemical profiles showed unpublished substances. This
46 information is important because these plants are commonly used for medicinal purposes and
47 as food for livestock production.

48 **Keywords:** *Aspidosperma pyrifolium*. *Combretum leprosum*. Mofumbo. Pereiro. Secondary
49 metabolites.

50 1.3.1. INTRODUÇÃO

51 Muitas das espécies vegetais podem possuir potencial fitoquímico e farmacológico, mas
52 necessitam de estudos científicos para comprovar estas atividades biológicas. Portanto,
53 ensaios biológicos vegetais podem ser utilizados para o monitoramento da bioatividade de
54 extratos, frações e compostos isolados de plantas (NOLDIN *et al.*, 2003). Para isso, o teste de
55 germinação com vegetais constitui-se em um modelo amplamente utilizado para avaliar o
56 potencial aleloquímico de extrato ou substâncias isoladas, de modo que quando um composto
57 interfere no metabolismo celular, por exemplo, o índice de germinação, pode revelar a sua
58 ação tóxica e/ou citotóxica (LUZ *et al.*, 2012).

59 *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae), conhecida como pereiro, é uma das
60 mais importantes plantas tóxicas da Caatinga. Para esta espécie foram relatados casos naturais
61 de aborto envolvendo caprinos, ovinos e bovinos, mas confirmados experimentalmente
62 apenas em cabras (MEDEIROS *et al.*, 2004). Outros relatos foram notificados como a causa
63 de morte em ratas grávidas, e efeitos hemolítico e letal em *Artemia salina* (LIMA; SOTO-
64 BLANCO, 2010).

65 Extratos de *A. pyrifolium* são, também, popularmente utilizados por humanos em casos
66 de problemas cardíacos, diarreia e como sedativo (ALMEIDA *et al.*, 2005). São, também,
67 aplicados no controle de fitopatógenos e como anti-malárico moderado (MUÑOZ *et al.*,
68 2000), cujo efeito é atribuído aos seus alcalóides indólicos (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002),
69 os quais estão associados aos efeitos inseticidas (TRINDADE *et al.*, 2008).

70 A espécie *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), popularmente conhecida como
71 mofumbo, é utilizada na medicina popular como agente de cura e prevenção de erupções
72 cutâneas e para limpeza de ferimentos (HORINOUCI *et al.*, 2013). Os estudos
73 farmacológicos com extratos e compostos isolados de diferentes partes dessa espécie sugerem
74 diversas atividades biológicas, como: efeitos anticolinesterásico (FACUNDO *et al.*, 2005),

75 antiulcerogênico (NUNES *et al.*, 2009), anticoncepcivo (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2012) e
76 anti-inflamatório e antiproliferativo (HORINOUCI *et al.*, 2013).

77 O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência alelopática de extratos aquosos de *A.*
78 *pyrifolium* e *C. leprosum* sobre *Allium cepa* (organismo-teste) e caracterizar o perfil
79 bioquímico qualitativo associado.

80 **1.3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

81 **Coleta das amostras** – Folhas de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* foram coletadas no
82 município de Russas, CE (4°50'59.9"S 37°53'29.9"W e 4°50'28.6"S 37°54'05.5"W,
83 respectivamente), no mês de abril de 2015. A identificação taxonômica foi obtida no Herbário
84 Dárdano de Andrade-Lima (UFERSA), sob os códigos 14525 e 10195, respectivamente. As
85 amostras foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e transportadas para Laboratório de
86 Genética e Evolução (LAGENE - UFERSA) para secagem e obtenção do extrato.

87 **Obtenção dos extratos** – os extratos aquosos do material vegetal seco foram obtidos
88 conforme Matsumoto *et al.* (2010) com modificações. As folhas foram selecionadas, secas à
89 temperatura ambiente e trituradas em liquidificador até obtenção de pó fino. Os extratos
90 aquosos 10% (p/v) foram preparados pela diluição de 100 g de cada material em água
91 destilada, em agitador magnético a 4 °C por 24 h. O material foi filtrado em malha de tecido
92 fino, seguido de filtração a vácuo com papel filtro (14 µm).

93 **Teste germinativo** - os bioensaios foram realizados em câmara de germinação do tipo
94 *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) com temperatura controlada de 20 °C e fotoperíodo de
95 12 h. Sementes de *Allium cepa*, variedade NUN 1205 F1, foram acondicionadas em caixas
96 plásticas do tipo *gerbox* (11 x 11 cm) forradas com dupla camada de papel mata-borrão
97 umedecido com solução de 10 mL dos diferentes tratamentos: (A) extrato de *A. pyrifolium*
98 (200; 400 e 800 mg/L) e (C) extrato de *C. leprosum* (200; 400 e 800 mg/L) e água destilada
99 (controle negativo - CN). Foram utilizadas quatro repetições estatísticas com 50 sementes em
100 cada réplica, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

101 A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada seguindo as recomendações das
102 Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) com contagens no intervalo de 24 h até o
103 décimo segundo dia, obtendo-se assim a germinação de primeira contagem (germinabilidade),
104 germinação e o índice de velocidade germinação (IVG). Foram consideradas germinadas as
105 sementes que apresentarem radícula com no mínimo 50% do tamanho da semente
106 (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

107 Os dados de germinação e comprimento de radícula foram calculados o índice de
108 crescimento relativo (ICR) e o índice de germinação (IG), de acordo com Varnero M., Rojas
109 A. e Orellana R. (2007), para visualização da influência dos tratamentos.

110 O cálculo desses valores foi realizado seguindo as equações:

111 $ICR = CRA/CRC$, onde, CRA é o comprimento da radícula na amostra e CRC é o
112 comprimento da radícula no controle negativo;

113 $IG = ICR \times (SGA/SGC) \times 100$, onde, ICR é o índice de crescimento relativo, SGA é o
114 número de sementes germinadas da amostra e SGC é o número de sementes germinadas no
115 controle negativo.

116 Os valores de ICR obtidos foram classificados em três categorias, de acordo com os
117 efeitos de toxicidade (YOUNG *et al.*, 2012): inibição do alongamento radicular (I) quando o
118 valor obtido para ICR está compreendido entre 0 e 0.8; sem efeito significativo (SES) quando
119 o valor obtido para ICR está igual ou entre 0.8 e 1.2; e estimulação do alongamento radicular
120 (E) quando o valor obtido para ICR é superior a 1.2.

121 Os valores de IG também foram classificados em três categorias, de acordo com a
122 presença de substâncias fitotóxicas (ZUCCONI *et al.*, 1981): ausência ou baixa concentração
123 de substâncias fitotóxicas, quando o valor obtido para IG é superior ou igual a 80; presença
124 moderada de substâncias fitotóxicas, quando o valor obtido para IG está compreendido entre

125 50 e 80; e alta concentração de substâncias fitotóxicas, quando o valor obtido para IG é
126 inferior ou igual a 50.

127 **Análise bioquímica qualitativa** – Foi verificada a presença de diversos compostos nos
128 extratos aquosos, de acordo com as metodologias de Matos (2009) e Barbosa (2001) para
129 determinação da presença de ácidos orgânicos, açúcares, alcaloides, antraquinonas, azulenos,
130 bases quaternárias, compostos fenólicos, esteroides, lactonas, saponinas espumídicas, e
131 terpenos.

132 As avaliações estatísticas foram realizadas pelo teste de normalidade de Cramer-von
133 Mises, e quando houve normalidade foi executada a análise de variância (ANOVA) com pos-
134 teste de Tukey ($p < 0,05$). Quando não houve normalidade foi realizada a análise não-
135 paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, com pos-teste de Dunn's ($p < 0,05$). Todas as
136 análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 6.01.

137 **1.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

138 Os resultados do teste de germinação, primeira contagem e índice de velocidade de
139 germinação (IVG) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Sendo assim, pode-se afirmar que
140 os extratos não apresentaram efeitos alelopáticos sobre a germinação, pois todos os
141 tratamentos obtiveram resultados semelhantes e indiscriminadamente apresentaram alto
142 percentual de germinação no início do teste, com cerca de 70% das sementes germinadas a
143 partir do terceiro dia, atingindo o ápice entre o quinto e sexto dia.

144 Resultados similares a este trabalho foram descritos por Borges *et al.* (2011), que
145 também não observaram efeito alelopático de extratos aquosos de mamona sobre a
146 germinação de sementes de *A. cepa*. Ferreira e Aquila (2000) defendem que o efeito
147 alelopático, frequentemente, não se dá sobre a germinação ou velocidade de germinação, mas
148 pode afetar outro parâmetro do processo, como o comprimento de raízes.

149 A influência dos extratos sobre o comprimento de raízes e a germinação foram
150 avaliados pelo índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) (Tabela 1).

151 **Tabela 1** - Índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) de *Allium cepa*
 152 sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*.

Tratamentos		ICR	IG (%)
Controle negativo		1 ^{ab}	100 ^{ab}
<i>A. pyrifolium</i>	200 mg/L	0.97 ± 0.14 ^{ab}	96.53 ± 11.87 ^{ab}
	400 mg/L	0.92 ± 0.09 ^{ab}	92.16 ± 8.22 ^{ab}
	800 mg/L	0.84 ± 0.07 ^{ab}	84.22 ± 7.52 ^{ab}
<i>C. leprosum</i>	200 mg/L	1.10 ± 0.12 ^a	110.98 ± 12.73 ^a
	400 mg/L	0.97 ± 0.16 ^{ab}	98.81 ± 14.86 ^{ab}
	800 mg/L	0.79 ± 0.09 ^b	80.05 ± 8.28 ^b

153 Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).
 154

155 O ICR obtido teve efeito não significativo sobre crescimento da radícula (SES), pois de
 156 acordo Young *et al.* (2012), valores de ICR compreendidos entre o intervalo de 0.8 e 1.2
 157 apresentam este comportamento. No entanto, foi observado diferença significativa entre os
 158 extratos de *C. leprosum* com 200 e 800 mg/L, revelando aparentemente efeito inversamente
 159 proporcional entre o ICR e a concentração, o que foi comprovado pela equação da reta ($Y = -$
 160 $0,1556x + 1,2683$, $R^2 = 0,991$). A diminuição do crescimento da radícula sob o tratamento com
 161 extrato de *C. leprosum* com 800 mg/L pode estar relacionada com a presença de metabolitos
 162 moderadamente fitotóxicos (VARNERO M.; ROJAS A.; ORELLANA R., 2007).

163 Varnero M., Rojas A. e Orellana R. (2007) propuseram que o índice de germinação (IG)
 164 seja um indicador mais adequado, que o índice de crescimento relativo (ICR), para
 165 caracterizar o potencial fitotóxico de um material orgânico. Este fato não foi observado para
 166 as amostras estudadas que apresentaram IG maiores que 80% (Tabela 1). Segundo Zucconi *et*
 167 *al.* (1981) valores de $IG \geq 80\%$ indicam a ausência de substâncias fitotóxicas ou que elas
 168 estão em baixa concentração. Deste modo, os valores de ICR e IG obtidos evidenciam que os
 169 extratos de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* não afetam a capacidade germinativa e o
 170 desenvolvimento radicular de *Allium cepa* nas concentrações testadas.

171 Os testes bioquímicos qualitativos descritos na Tabela 2 revelaram a presença de
 172 compostos primários ao metabolismo, como ácidos orgânicos e carboidratos (açúcares

173 redutores). No entanto, não foram identificados a presença de polissacarídeos, comuns em
 174 extratos aquosos.

175 **Tabela 2** - Perfil fitoquímico das substâncias presentes no extrato aquoso de *A. pyrifolium* e
 176 *C. leprosum*.

Metabólito	Princípio de avaliação	<i>A. pyrifolium</i>		<i>C. leprosum</i>	
		Res	Ref	Res	Ref
Ácidos Orgânicos	Reativo de Pascová	*	NP	+	Facundo <i>et al.</i> (2005)
Açúcares					
Redutores	Reativo de Tollens e Fehling	*	NP	+	Facundo <i>et al.</i> (2005)
Polissacarídeos	Lugol	-	NP	-	NP
Alcalóides	Reativo de Bouchardat e Mayer	+	Nogueira <i>et al.</i> (2014)	-	NP
Antraquinonas	Extração em tolueno, H ₂ SO ₄ , NH ₄ OH	-	NP	-	NP
Azulenos	p-dimetilaminobenzaldeído	*	NP	*	NP
Bases quaternárias	Reativo de Bouchardat e Mayer	-	NP	-	NP
Compostos fenólicos					
Depsídeos e depsidonas	FeCl ₃	-	NP	*	NP
Fenóis e Taninos	FeCl ₃	+	Almeida <i>et al.</i> (2005)	+	Nunes <i>et al.</i> (2009)
Flavonoides	HCl, Magnésio	*	NP	+	Facundo <i>et al.</i> (1993)
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	HCl, Magnésio	*	NP	-	Facundo <i>et al.</i> (1993);
Catequinas	Vanilina	-	NP	+	Lopes <i>et al.</i> (2010)
Esteroides	Teste de Lieberman-Burchard	*	NP	*	NP
Lactonas					
Derivados de cumarina	Fluorescência	-	NP	-	NP
Sesquiterpenolactonas e outras lactonas	NH ₂ OH.HCl, KOH, FeCl ₃ , HCl	-	NP	-	NP
Saponinas espumílica	Teste de afrogenicidade, Teste confirmatório	-	NP	+	Nunes <i>et al.</i> (2009)
Terpenos					
Carotenóides	Tricloreto de Antimônio	*	NP	-	NP
Triterpenoides	Teste de Lieberman-Burchard	-	Almeida <i>et al.</i> (2005)	-	Evaristo <i>et al.</i> (2014); Facundo <i>et al.</i> (1993)

177 Res = resultado (+ = presente, - = ausente, e * = presente e inédito); Ref = referência (NP = Não publicado).

178

179 *A. pyrifolium* apresentou alcaloides já amplamente estudados para a espécie (MITAINE-
 180 OFFER *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2014; TRINDADE *et al.*, 2008) e carotenoides,
 181 comumente associados a fotorrecepção, fotoproteção, proteção antioxidante e citotoxicidade de
 182 células cancerígenas (ESTEBAN *et al.*, 2015).

183 Azulenos, que possuem propriedade anti-inflamatória (GUARRERA TURBINO;
184 REBORA 2001) foram encontrados em ambas as espécies.

185 Fenóis, taninos e flavonoides também foram observados em ambas espécies.
186 Flavonoides possuem efeitos anti-proliferativos (AMMAR *et al.*, 2008) e são antioxidantes,
187 juntamente com taninos, saponinas, fenóis e terpenóides (ANANTHI *et al.*, 2010). Alguns
188 antioxidantes são conhecidos por serem agentes anti-mutagênicos universais, como o ácido
189 ascórbico (vitamina C) e β -caroteno.

190 O fato dos extratos estudados não afetarem a sanidade vegetal é importante para as
191 situações em que se visa o controle de parasitas associados a plantas, sejam eles bactérias,
192 fungos, ou insetos. Alguns estudos demonstraram o efeito inseticida de *A. pyrifolium*. O
193 extrato aquoso das cascas são repelentes a larvas de primeiro instar e ovicida sobre os ovos da
194 traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), (TORRES
195 *et al.*, 2006), enquanto que a fração etanólica rica em alcaloides apresenta excelentes
196 propriedades inseticidas contra larvas da traça-das-crucíferas (TRINDADE *et al.*, 2008).

197 Os depsídeos, depsídonas e saponinas espumificas foram observados em *C. leprosum*.
198 Extratos e substâncias de *C. leprosum* também têm sido estudados quanto a seus efeitos
199 farmacológicos de interesse humano, como anti-inflamatório (HORINOUCI *et al.*, 2013),
200 antinociceptivo (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2012), gastroprotetor e anti-ulcerogênico
201 (NUNES *et al.*, 2009) e antibacteriano (EVARISTO *et al.*, 2014).

202 **1.3.4. CONCLUSÕES**

203 1. Os extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* e *Combretum leprosum* não
204 apresentam efeito alelopático, mas os perfis bioquímicos revelam substâncias inéditas para
205 ambas espécies.

206 2. Muitos compostos constituintes dos extratos podem atuar sinergicamente ou disfarçar
207 seus efeitos sobre os aspectos germinativos, sendo necessários mais estudos para melhor
208 caracterização fitoquímica de *Aspidosperma pyrifolium* e *Combretum leprosum*.

209 **1.3.5. REFERÊNCIAS**

- 210 ALMEIDA, C.F.C.B.R. *et al.* Life strategy and chemical composition as predictors of the
211 selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Envi-**
212 **ronments**, v. 62, n. 1, p. 127-142, 2005.
- 213 AMMAR, R.B. *et al.* Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of
214 Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the
215 Phytochemical Composition. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 61–80, 2008.
- 216 ANANTHI, R. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root
217 extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 558–560,
218 2010.
- 219 BARBOSA, W.L.R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos**
220 **vegetais, Belém - PA.** Revista Científica da UFPA, v. 4, 2001. 19 p.
- 221 BORGES, C.S. *et al.* Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus*
222 *communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 5, n.
223 3, p. 15-20, 2011.
- 224 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de**
225 **sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
226 Agropecuária. Brasília, Mapa/ACS, 2009. 395p.
- 227 ESTEBAN, R. *et al.* Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution,
228 functional roles and environmental interactions. **Environmental and Experimental Botany**,
229 v. 119, p. 63–75, 2015.
- 230 EVARISTO, F.F.V. *et al.* Antimicrobial effect of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -Trihydroxylup-
231 20(29)-ene on planktonic cells and biofilms from gram positive and gram negative bacteria.
232 **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- 233 FACUNDO, V.A. *et al.* Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root
234 and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative

235 disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian**
236 **Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1309–1312, 2005.

237 FACUNDO, V.A. *et al.* Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*.
238 **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 411–415, 1993.

239 FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopátia: uma área emergente da ecofisiologia.
240 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (edição especial), p. 175-204, 2000.

241 GUARRERA, M.; TURBINO, L.; REBORA, A. The anti-inflammatory activity of azulene.
242 **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. 5, p. 486–
243 487, 2001.

244 HORINOUCI, C.D.S. *et al.* *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an
245 antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1,
246 p. 311–319, 2013.

247 LIMA, M.C.J.S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.:
248 Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 320–324, 2010.

249 LONGHI-BALBINOT, D.T. *et al.* Anti-inflammatory effect of triterpene 3b, 6b, 16b-
250 trihydroxylup-20 (29) - ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice.
251 **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 59–64, 2012.

252 LOPES, L.S. *et al.* Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-)
253 epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical**
254 **and Biological Research**, v. 43, n. 12, p. 1184–1192, 2010.

255 LUZ, A.C. *et al.* Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em
256 sistemas teste *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 635–642,
257 2012.

258 MATOS, F.J.A. **Introdução fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 3. ed.,
259 2009. 150 p.

260 MATSUMOTO, R.S. *et al.* Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L.
261 (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.

262 MEDEIROS, R.M.T. *et al.* Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por
263 *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24 (Supl.), p. 42-43, 2004.

264 MITAINE-OFFER, A.C. *et al.* Antiplasmodial activity of *Aspidosperma indole* alkaloids.
265 **Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 142–145, 2002.

266 MUÑOZ, V. *et al.* A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a
267 multidisciplinary approach: Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by
268 Alteños Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 123–131, 2000.

269 NOGUEIRA, P.C.N. *et al.* Plumeran alkaloids and glycosides from the seeds of
270 *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p.
271 2108-2120, 2014.

272 NOLDIN, V.F. *et al.* Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L.
273 cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 635-642, 2012.

274 NUNES, P.H. *et al.* Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Die Pharmazie**, v. 64,
275 n. 1, p. 58–62, 2009.

276 TORRES, A.L. *et al.* Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e
277 *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**,
278 v. 65, n. 3, p. 447–457, 2006.

279 TRINDADE, R.C.P. *et al.* Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma*
280 *pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1813–1816,
281 2008.

282 VARNERO M., M.T.; ROJAS A., C.; ORELLANA R., R. Índices de fitotoxicidad en
283 residuos orgánicos durante el compostaje. **Revista de la ciencia del suelo y nutrición**
284 **vegetal**, v. 7, n. 1, p. 28–37, 2007.

- 285 YOUNG, B. J. *et al.* Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal
286 residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 182-
287 186, 2012.
- 288 ZUCCONI, F. *et al.* Evaluating toxicity in immature compost. **Biocycle**, v. 22, n. 2, p. 54–57,
289 1981.

2. CAPÍTULO II – TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE PEREIRO E MOFUMBO COM O TESTE *Allium cepa*

Trabalho a ser submetido a revista:

REVISTA CAATINGA

Página eletrônica: <http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema>

ISSN: 1983-2123

1 **TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE PEREIRO E MOFUMBO COM O TESTE**

2 *Allium cepa*

3
4 **RESUMO** – O bioma Caatinga possui grande diversidade vegetal responsável pela
5 subsistência de animais e pessoas, estas por sua vez, utilizam algumas plantas para fins
6 medicinais. A etnofarmacologia é uma fonte comum para a prospecção de fitofármacos, mas,
7 mesmo que com sua eficiência seja comprovada, não possuem segurança toxicológica,
8 citotóxica ou genotóxica. *Aspidosperma pyrifolium* e *Combretum leprosum* são exemplos de
9 plantas que apresentam diversos usos medicinais. Buscou-se verificar a citotoxicidade de
10 extratos aquosos de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* e a composição dos compostos fenólicos
11 constituintes. 50 sementes de *A. cepa* foram colocadas na presença dos extratos aquosos
12 dessas plantas nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/L, com quatro réplicas cada, sendo
13 avaliados vários parâmetros: comprimento e matéria seca de raízes, hipocótilos e plântulas,
14 densidade de biomassa de plântulas e índice mitótico das raízes, além de dosagem de
15 polifenóis, antocianinas e flavonoides. Os extratos apresentaram efeitos tóxicos nas menores
16 concentrações na maioria das análises, contudo alterações sobre a concentração de 800 mg/L
17 foram recorrente, podendo estar associado ao fator de dissociação de cada componente dos
18 extratos, fazendo com que tenham, em conjunto, efeitos distintos em cada concentração, não
19 seguindo um modelo dose-resposta. Estudos com concentrações superiores são necessários
20 para elucidar a toxidade e citotoxicidade dos extratos aquosos de ambas as espécies.

21
22 **Palavras – chave:** *Aspidosperma pyrifolium*. *Combretum leprosum*. Tóxico. Citotóxico.

23
24
25 **TOXICITY AND CYTOTOXICITY OF PEREIRO AND MOFUMBO WITH *Allium***
26 ***cepa* TEST**

27
28
29 **ABSTRACT** – The biome Caatinga has great plant diversity responsible for the maintenance
30 of animals and people, in turn use some plants for medicinal purposes. The
31 ethnopharmacology is a common source for prospecting phytopharmaceuticals, but even with
32 its efficiency is tested, have no toxicological, cytotoxic or genotoxic security. *Aspidosperma*
33 *pyrifolium* and *Combretum leprosum* are examples of plants that have several medicinal uses.
34 He attempted to check the cytotoxicity of aqueous extracts of *A. pyrifolium* and *C. leprosum*

35 and the composition of the constituent phenolic compounds. 50 seeds of *A. cepa* were placed
36 in the presence of aqueous extracts of these plants in concentrations of 200, 400 and 800
37 mg/L, with four replicates each, and reviews various parameters: length and dry matter of
38 roots, hypocotyl and seedling, seedling biomass density and mitotic index, and dosage of
39 polyphenols, anthocyanins, and flavonoids. The extracts showed toxic effects at lower
40 concentrations in most analyzes, however changes on the concentration of 800 mg/L were
41 applicant, may be linked to dissociation factor of each component of the extract, so that they
42 together different effects each concentration, not following a dose-response model. Studies
43 with higher concentrations are needed to address the toxicity and cytotoxicity of aqueous
44 extracts of both species.

45

46 **Keywords:** *Aspidosperma pyrifolium*. *Combretum leprosum*. Toxic. Cytotoxic

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68 INTRODUÇÃO

69

70 A divulgação das características terapêuticas dos vegetais se dá principalmente pelas
71 observações populares do uso e da eficácia dessas plantas, mesmo sem o conhecimento de
72 seus constituintes químicos. Se desperta, então, o interesse de pesquisadores em diversas
73 áreas, como botânica, farmacologia e fitoquímica, as quais associadas aumentam as
74 informações sobre a inexaurível a flora, fonte medicinal natural (MACIEL et al., 2002).

75 A Caatinga apresenta clima semiárido, quente e seco, resultando basicamente em
76 vegetação xerófila (ALMEIDA et al., 2005), mas, devido incluir outros ambientes associados
77 apresenta diversificada vegetação, sendo reconhecidas 12 tipologias diferentes de Caatinga.
78 Subentende-se, então, que a relação entre os fatores abióticos (como solo, clima,
79 pluviosidade) podem explicar parcialmente a diversidade de fisionomias aliada à composição
80 florística, com muitas espécies vegetais endêmicas no bioma (MELO e ANDRADE, 2007).

81 *Aspidosperma pyrifolium* Mart., pereiro, é uma espécie popularmente conhecida pelo
82 uso como anti-inflamatória do trato urinário, antinociceptiva visceral (dor de estômago,
83 cólicas), por amenizar e prevenir problemas cardíacos, dermatite e sedativo (ALMEIDA et al.,
84 2005; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007), podendo ser utilizada
85 agronomicamente no controle de fitopatógenos (MUÑOZ et al., 2000). Ela também apresenta
86 atividade antimalárica moderada (MUÑOZ et al., 2000), sendo seus alcalóides indólicos
87 eficazes (MITAINE-OFFER et al., 2002), também associados a efeitos inseticidas
88 (TRINDADE et al., 2008).

89 *Combretum leprosum* Mart., mofumbo (LIRA et al., 2002) é uma espécie utilizada na
90 medicina popular como um agente de cura e prevenção de afecções a pele (HORINOUCI et
91 al., 2013), expectorante e antitússico (AGRA et al., 2007), sedativo, antidiarreico, bronquite,
92 gripe, coqueluche, difteria, azia, hemostático (ALBUQUERQUE et al, 2007; PAULINO et
93 al., 2012) e ainda como antiofídico (MORS et al., 2000).

94 Os estudos farmacológicos com extratos e compostos isolados de diferentes partes da
95 planta sugerem que as atividades biológicas de *C. leprosum* incluem efeitos
96 anticolinesterásico (FACUNDO et al., 2005), antiulcerogênico (NUNES et al., 2009),
97 antinociceptivo (LONGHI-BALBINOT et al., 2012), anti-inflamatório e antiproliferativo
98 (HORINOUCI et al., 2013), e contra a forma promastigota de *Leishmania amazonenses*
99 (TELES et al., 2011).

100 Além das utilizações medicinais, as espécies são utilizadas como forrageiras para
101 animais de produção (DAMASCENO; SOUTO; SOUTO, 2010), sendo *A. pyrifolium*

102 reconhecida como tóxica a pequenos ruminantes (MEDEIROS et al., 2004; LIMA; SOTO-
103 BLANCO, 2010). Nesse contexto, buscou-se verificar a toxicidade e citotoxicidade de extratos
104 aquosos de *A. pyriforme* e *C. leprosum* e identificar e descrever a composição dos compostos
105 fenólicos constituintes, visando contribuir com o conhecimento toxicológico sobre estas
106 espécies.

107

108

109 MATERIAL E MÉTODOS

110

111 **Coleta das amostras** – Folhas de *A. pyriforme* e *C. leprosum* foram coletadas no
112 município de Russas, CE (4°50'59.9"S 37°53'29.9"W e 4°50'28.6"S 37°54'05.5"W,
113 respectivamente), no mês de abril de 2015. A identificação taxonômica foi obtida no Herbário
114 Dárdano de Andrade-Lima (UFERSA), sob os códigos 14525 e 10195, respectivamente. As
115 amostras foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e transportadas para Laboratório de
116 Genética e Evolução (LAGENE - UFERSA) para secagem e obtenção do extrato.

117 **Obtenção dos extratos** – os extratos aquosos do material vegetal seco foram obtidos
118 conforme Matsumoto *et al.* (2010) com modificações. As folhas foram selecionadas, secas à
119 temperatura ambiente e trituradas em liquidificador até obtenção de pó fino. Os extratos
120 aquosos 10% (p/v) foram preparados pela diluição de 100 g de cada material em água
121 destilada, em agitador magnético a 4 °C por 24 h. O material foi filtrado em malha de tecido
122 fino, seguido de filtração a vácuo com papel filtro (14 µm).

123 **Teste germinativo** - os bioensaios foram realizados em câmara de germinação do tipo
124 *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) com temperatura controlada de 20 °C e fotoperíodo de
125 12 h. Sementes de *Allium cepa*, variedade NUN 1205 F1, foram acondicionadas em caixas
126 plásticas do tipo *gerbox* (11 x 11 cm) forradas com dupla camada de papel mata-borrão
127 umedecido com solução de 10 mL dos diferentes tratamentos: (A) extrato de *A. pyriforme*
128 (200; 400 e 800 mg/L) e (C) extrato de *C. leprosum* (200; 400 e 800 mg/L) e água destilada
129 (controle negativo - CN) e sulfato de cobre 3 mg/L (controle positivo - CP). Foram utilizadas
130 quatro repetições estatísticas de 50 sementes para cada réplica, em delineamento estatístico
131 inteiramente casualizado, segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes
132 (BRASIL, 2009).

133 Seguindo metodologia de Pereira et al. (2009) com modificações, para obtenção dos
134 comprimentos das plântulas e de suas partes (hipocótilo e radícula), os cotilédones foram
135 removidos e os hipocótilos separados das radículas. Os hipocótilos e as radículas foram então

136 colocados em sacos de papel distintos, os quais foram mantidos em estufa, sob temperatura de
137 60 ± 1 °C por 72 h. Ao final deste período, foi obtido, em miligramas, o peso de massa seca
138 do hipocótilo e radícula. Os resultados foram expressos em pesos médios, ou seja, o peso de
139 massa seca dividido pelo número de plântulas colocadas no saco de papel para secar. O peso
140 de massa seca por plântula foi obtido a partir da soma dos pesos médios de massa seca do
141 hipocótilo e radícula.

142 Adicionalmente, foi avaliado o peso de biomassa seca por centímetro de plântula, ou
143 seja, a densidade de biomassa (DB). Para a obtenção dos valores desta variável, expressa em
144 miligramas por centímetro de plântula (mg/cm), foi utilizada a fórmula (PEREIRA et al.,
145 2009):

$$146 \quad DB = \text{Peso} / \text{Comprimento}$$

147 Este valor foi obtido a partir das medidas de peso e comprimento de cada plântula da
148 parcela.

149 Para a análise citogenética, realizou-se os testes de índice mitótico (IM) empregando a
150 técnica de esmagamento (GUERRA; SOUZA, 2002). Quando as raízes atingiram 2,0 cm de
151 comprimento (aproximadamente cinco dias após o início do ensaio) (LEME; ANGELIS;
152 MARIN-MORALES, 2008), as raízes (duas raízes de cada réplica) foram colocadas em
153 solução fixadora de Carnoy (etanol: ácido acético – 3:1) durante 24h. Para o preparo das
154 lâminas, as raízes foram retiradas do fixador, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min),
155 hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C por 11 minutos e lavadas mais uma vez em água destilada.
156 Em seguida, com auxílio de uma pinça e de uma lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da
157 raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada e colocada sob uma
158 lâmina. Adicionou-se uma gota de carmim acético 2% e corado durante 5 minutos. A
159 lamínula foi então colocada sobre a lâmina e foi realizado o squash (esmagamento) com o
160 dedo polegar, com razoável pressão (GUERRA; SOUZA, 2002).

161 As lâminas de cada bioindicador foram analisadas, pelo método de varredura, em
162 microscópio óptico para observação no aumento de 400X, 4 repetições de 1000
163 células/tratamento, com um total de 4000 células por tratamento. O índice mitótico foi obtido
164 dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observadas e
165 multiplicando-se por 100, sendo analisada a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase.
166 Também foi calculado o valor limite da citotoxicidade, segundo a equação:

$$167 \quad \text{Valor limite da citotoxicidade} = \text{IMA} / \text{IMC} \times 100,$$

168 onde, IMA é o índice mitótico da amostra, e IMC é o índice mitótico do controle negativo.

169 **Análise bioquímica quantitativa** – Foram quantificados os polifenóis extraíveis totais
 170 (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997), antocianina e flavonoides amarelos
 171 (FRANCIS, 1982). Para esta análise de extratos foram utilizados os protocolos do Laboratório
 172 de Pós-Colheira, UFERSA, com algumas modificações.

173 **Análise estatística** - As avaliações estatísticas foram realizadas através de Análise de
 174 Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), a normalidade foi verificada pelo
 175 teste de Cramer-von Mises. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software R
 176 versão 3.1.3.

177

178

179 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

180

181 O comprimento de raízes não foi afetado significativamente pelos extratos em relação
 182 ao controle negativo. Já quanto ao comprimento do hipocótilo foi identificada uma redução de
 183 12,1% e 18,2% em relação ao controle negativo, respectivamente nas raízes tratadas com
 184 extrato aquoso de *A. pyrifolium* com 200 e 800 mg/L. Os hipocótilos tratados com extrato
 185 aquoso de *Combretum leprosum* não diferiram dos controles.

186 Quanto ao comprimento das plântulas, obtido pelo somatório do comprimento das
 187 raízes e hipocótilos, apenas com os extratos de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* com 800 mg/L foi
 188 observada redução significativa em relação ao controle negativo, 17.9% e 11.9%
 189 respectivamente (Tabela 1).

190

191 **Tabela 1.** Crescimento vegetal, matéria seca e densidade de biomassa de raízes, hipocótilos e
 192 plântulas de sementes de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A. pyrifolium* e extrato aquoso
 193 de *C. leprosum*.

194

Tratamento	Raiz	Hipocótilo	Plântula
	Comprimento (mm) / Redução (%)		
Controle Negativo	15,7 ± 2 ^{ab}	42,8 ± 3,2 ^{ab}	58,7 ± 2,2 ^a
Controle Positivo	17 ± 3,4(-8,3) ^a	40,4 ± 2,8(5,6) ^{abc}	57,4 ± 6,2(2,2) ^{ab}
200 mg/L	15,2 ± 2,1(3,2) ^{ab}	37,6 ± 2,4(12,1) ^{cd}	52,3 ± 3,9(10,9) ^{abc}
<i>A. pyrifolium</i> 400 mg/L	14,4 ± 1,5(8,3) ^{ab}	43,4 ± 2,0(-1,4) ^a	57,8 ± 3,4(1,5) ^{ab}
800 mg/L	13,2 ± 1,1(15,9) ^b	35 ± 1,9(18,2) ^d	48,2 ± 2,4(17,9) ^c

	200 mg/L	17,4 ± 1,9(-10,8) ^a	39,2 ± 1,7(8,4) ^{bc}	56,7 ± 1,7(3,4) ^{ab}
<i>C. leprosum</i>	400 mg/L	15,3 ± 2,4(2,5) ^{ab}	42,1 ± 1,6(1,6) ^{ab}	57,4 ± 3,5(2,2) ^{ab}
	800 mg/L	12,5 ± 1,4(20,4) ^b	41,6 ± 1,7(2,8) ^{abc}	51,7 ± 5,5(11,9) ^{bc}
Matéria seca (mg)				
Controle Negativo		518,2 ± 56,1 ^{bc}	1362,6 ± 124,5 ^a	1880,8 ± 169,2 ^a
Controle Positivo		660,4 ± 65,1(-27,4) ^a	1346,8 ± 106,7(1,2) ^{ab}	2007,2 ± 122,5(-6,7) ^a
	200 mg/L	464,6 ± 27,4(10,3) ^c	1182,3 ± 124,7(13,2) ^c	1646,9 ± 132,1(12,4) ^b
<i>A. pyrifolium</i>	400 mg/L	578,8 ± 33(10,3) ^{ab}	1300,7 ± 108(4,5) ^{abc}	1879,4 ± 128,2(0,1) ^a
	800 mg/L	458,2 ± 62,6(-11,7) ^c	1224,4 ± 59,4(10,1) ^{abc}	1682,6 ± 98,1(10,5) ^b
	200 mg/L	456,4 ± 26,1(11,9) ^c	1204,1 ± 66,1(11,6) ^{bc}	1660,5 ± 58,9(11,7) ^b
<i>C. leprosum</i>	400 mg/L	636,7 ± 58,3(-22,9) ^a	1299,4 ± 69(4,6) ^{abc}	1936,1 ± 82,2(-2,9) ^a
	800 mg/L	602,4 ± 59,1(-16,2) ^{ab}	1349,9 ± 43,8(0,9) ^{ab}	1952,4 ± 56,2(-3,8) ^a
Densidade de biomassa (mg/cm)				
Controle Negativo	-	-	-	320,6 ± 27,3 ^{bc}
Controle Positivo	-	-	-	353,4 ± 50,1(-10,2) ^{ab}
	200 mg/L	-	-	316,6 ± 35,9(1,2) ^{bc}
<i>A. pyrifolium</i>	400 mg/L	-	-	325,8 ± 28(-1,6) ^{bc}
	800 mg/L	-	-	249,9 ± 31,6(22,1) ^{ab}
	200 mg/L	-	-	292,2 ± 10,4(8,9) ^c
<i>C. leprosum</i>	400 mg/L	-	-	337,9 ± 15,5(-5,4) ^{abc}
	800 mg/L	-	-	381 ± 41,5(-18,8) ^{ab}

195 Médias ± desvio padrão (porcentagem) valores seguidos da mesma letra na mesma coluna e
196 categoria não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores
197 percentuais negativos de redução indicam valores maiores do que o controle negativo do fator
198 avaliado.

199

200 A matéria seca das raízes sob extrato de *C. leprosum* com 200 e 400 mg/L, diferiram do
201 controle negativo, com uma redução de 11,9% e um aumento de 22,9%, respectivamente. Os
202 hipocótilos sob os tratamentos com extratos de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* com 200 mg/L
203 tiveram uma redução de 13,2% e 11,6 %, respectivamente, apenas estes diferiram do controle
204 negativo.

205 As plântulas apresentaram redução significativa sob os tratamentos com extrato *A.*
206 *pyrifolium* com 200 e 800 mg/L (12,4% e 10,5%, respectivamente) e *C. leprosum* com

207 200mg/L (11,7%). Entretanto, a densidade de biomassa, um parâmetro que correlaciona a
208 matéria seca com comprimento das plântulas, não identificou nenhuma influência significava
209 dos tratamentos em relação ao controle negativo.

210 Estas inibições do crescimento (comprimento e matéria seca) observadas em *Allium*
211 *cepa* podem ocorrer devido à presença de sesquiterpenolactonas, as quais potencialmente
212 podem inibir a síntese de DNA, prejudicando a divisão celular normal, como observado com a
213 redução do índice mitótico em células de *A. cepa* tratadas com extrato aquoso de *Distephanus*
214 *angulifolius*, o qual apresenta substâncias pertencentes a classe (CHUKWUJEKWU; VAN
215 STADEN, 2014). De forma similar, os alcalóides presentes em *Erythrina* inibem a síntese de
216 DNA e proteínas (PARSONS; WILLIAMS, 2000), sendo este grupo bastante comum em *A.*
217 *pyrifolium* (NOGUEIRA et al., 2014).

218 Congruente a esses efeitos, alguns metais pesados nos extratos podem inferir redução da
219 divisão celular, assim como os obtidos de *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*,
220 *Cymbopogon citratus* e *Morinda lucida*, os quais apresentam zinco, cobre, manganês, ferro,
221 cádmio e chumbo em diferentes concentrações (AKINBORO; BAKARE, 2007; AJASA et al.,
222 2004; HAIDER et al., 2004).

223 Em contrapartida, cumarinas e flavonoides tem sido atribuídas a processos anti-
224 proliferativos e antioxidantes (KOSTOVA, 2006; BEN AMMAR et al., 2008). Os
225 antioxidantes são conhecidos por serem agentes anti-mutagênicos universais (ODIN, 1997;
226 SARKAR ET AL., 1997; GIRI; KHYNRIAM; PRASAD, 1998), tem como comuns
227 representantes o ácido ascórbico (vitamina C) e β -caroteno, mas também os taninos (KAUR;
228 GROVER; KUMAR, 2000), as auronas (ZAMPINI et al., 2008; KAUR et al., 2009), os
229 flavonoides (ZHAI et al., 1998; PÉREZ-CARREON et al., 2002), as saponinas (LEE et al.,
230 1999), fenóis e terpenóides (ANANTHI et al., 2010) que possuem efeitos anti-mutagênicos e,
231 todos exceto estes dois últimos, foram encontrados no extrato aquoso de *Erythrina velutina*,
232 que apresentou efeito antígenotóxico (SILVA et al., 2013).

233 O grupo hidroxila presente em compostos fenólicos tem propriedades redox, permitindo
234 atuar como agente redutor (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; PIETTA, 2000), apesar que
235 Ivanova et al. (2005) sugere que nem todos polifenóis possuem atividade antioxidante. Muitas
236 dessas substâncias citadas acima podem ser identificadas qualitativamente em ambos
237 extratos, o que pode está correlacionado a variabilidade dos efeitos (redução ou aumento) nas
238 diferentes concentrações dos extratos testados.

239 Foi observado que o sulfato de cobre 3 mg/L não se mostrou um controle positivo
 240 eficiente, pois foi verificada igualdade estatística com o controle negativo em todas as fases
 241 da mitose e no índice mitótico (Tabela 2).

242 Estas condições divergem do estudo realizado por Yıldız et al. (2009), o qual observou
 243 diferença estatística significativa do tratamento com água destilada (controle negativo) e
 244 igualdade com metil-metanosulfonato 10 mg/L, um controle positivo comumente utilizado no
 245 teste de *Allium cepa* (SILVA et al., 2013; FRANCO et al., 2015). Uma diferença importante,
 246 é que nos trabalhos acima citados ocorreram trocas diárias das soluções nas quais as raízes
 247 estavam expostas, evitando oxidação e neste trabalho foi utilizado apenas uma solução única
 248 que teve o volume completado diariamente.

250 **Tabela 2.** Índice mitótico e valor limite de citotoxicidade de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso
 251 de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)	VLC (%)	
Controle Negativo	6,3 ± 1,3 ^{bc}	7,5 ± 3,1 ^a	14,5 ± 4,5 ^{ab}	3 ± 0,8 ^{bc}	3,1 ± 0,6 ^{ab}	-*	
Controle Positivo	6 ± 6 ^{bc}	6,5 ± 6 ^a	12,3 ± 8,1 ^{ab}	1,5 ± 1,3 ^c	2,3 ± 2,1 ^{ab}	74	
<i>A. pyrifolium</i>	200 mg/L	13,3 ± 2,2 ^a	11,8 ± 2,4 ^a	12,3 ± 5,2 ^{ab}	5,5 ± 1,7 ^b	4,3 ± 0,7 ^a	137
	400 mg/L	13 ± 3,5 ^{ab}	8 ± 6,3 ^a	8,5 ± 5,8 ^{ab}	9,7 ± 1,5 ^a	4,5 ± 0,1 ^a	143
	800 mg/L	7,5 ± 3 ^{abc}	7 ± 2,9 ^a	12,5 ± 3,3 ^{ab}	2,7 ± 2,1 ^{bc}	3,1 ± 1,2 ^{ab}	100
<i>C. leprosum</i>	200 mg/L	2,8 ± 1,5 ^c	3,8 ± 2,6 ^a	2,8 ± 2,4 ^b	2,5 ± 1,9 ^{bc}	1,2 ± 0,5 ^b	38 ^{Sb}
	400 mg/L	10 ± 1,2 ^{ab}	10,8 ± 4,8 ^a	17 ± 7 ^a	3,5 ± 1 ^{bc}	4,1 ± 1,2 ^a	132
	800 mg/L	7,5 ± 3,1 ^{abc}	3 ± 2,6 ^a	9,5 ± 4,4 ^{ab}	3,3 ± 1,5 ^{bc}	2,7 ± 1,3 ^{ab}	86

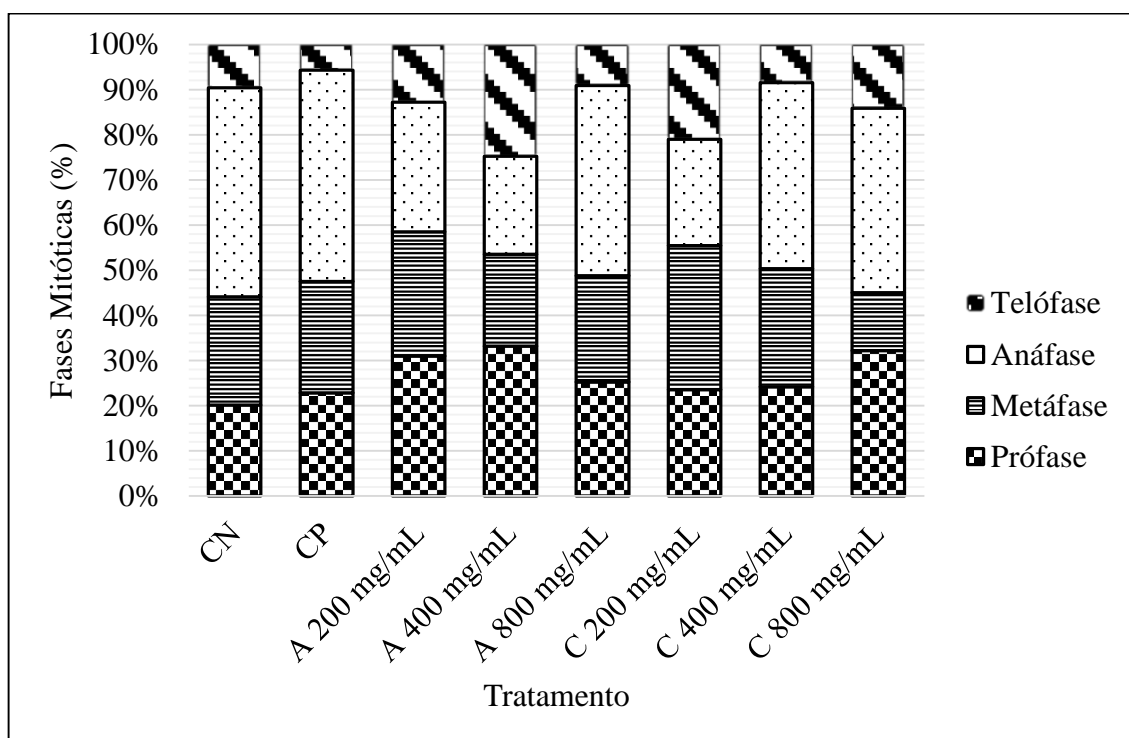
253 Médias ± desvio padrão na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem
 254 estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Valor de referência para o valor
 255 limite de citotoxicidade (VLC). Sb – subletal.

256
 257 A avaliação das células em mitose sob o tratamento do extrato aquoso de *A. pyrifolium*
 258 mostrou que elas não diferiram estatisticamente significativamente, com exceção das células
 259 em telófase, sob o tratamento 400 mg/L que apresentaram aumento de seu número médio,
 260 resultando em uma distribuição em parábola negativa. O índice mitótico (IM) deste
 261 tratamento apresentou valores médios iguais ou superiores aos observados no controle
 262 negativo, refletindo em valores limites de citotoxicidade ≥ 100% (Tabela 2).

263 Na análise do IM no bioensaio com extrato de *C. leprosum* (Tabela 2) observou-se que os
 264 valores não diferiram estatisticamente do controle negativo, mas o tratamento com 200 mg/L
 265 apresentou uma diferença em relação ao tratamento com 400 mg/L. Os valores médios das
 266 células em mitose observadas com 400 mg/L de *C. leprosum* diferiram apenas do tratamento
 267 com 200 mg/L e exclusivamente em prófases e metáfases, resultando em IM de 4,1%, com
 268 VLC de 132%. Isso pode ter ocorrido devido a dissociação de algumas substâncias químicas
 269 devido ao maior volume de água do tratamento com 400 mg/L em relação ao de 200 mg/L,
 270 levando a uma redução no número de células em divisão, o que refletiu no valor limite de
 271 citotoxicidade (VLC), sendo esta substância classificada como subletal a 38%.

272 O sistema de controle do ciclo celular efetua processos regulatórios baseando-se em
 273 pontos de verificação, sendo os três principais: início ou G1/S; G2/M; transição metáfase-
 274 anáfase (MORGAN, 2007). No entanto, quando analisadas as células expostas a tratamentos
 275 com extratos de *A. pyrifolium* e *C. leprosum* foi observado um bloqueio do ciclo celular em
 276 anáfase, como é evidenciado pelo aumento na proporção de células em anáfase (Figura 1),
 277 para ambas espécies.

278



279

280 **Figura 1.** Percentual das fases do ciclo celular de *Allium cepa* sob o efeito do extrato aquoso de *A.*
 281 *pyrifolium* (A) e extrato aquoso de *C. leprosum* (C), nas concentrações 200, 400 e 800 mg/L, controle
 282 negativo (CN) e controle positivo (CP).

283

284 Existe uma correlação linear entre os parâmetros macroscópicos e microscópicos, de
 285 modo que em *Allium cepa*, com a redução do crescimento de raízes, também ocorre redução
 286 do número de células em divisão, ou seja, do índice mitótico (FISKESJÖ, 1985;
 287 AKINBORO; BAKARE, 2007; BORGES et al., 2011), que ocorre no meristema apical,
 288 podendo ser observado em associação com o aparecimento de raízes atrofiadas, indicando
 289 atraso no crescimento e citotoxicidade (YILDIZ et al., 2009), esta correlação pode também ser
 290 putativamente associada a matéria seca, pois ela é produto do crescimento e alongamento
 291 celular multidimensional. No entanto, o comprimento e a matéria seca nos diferentes tecidos
 292 observados nesse estudo aparentemente não estão correlacionados com o índice mitótico.

293 As análises bioquímicas quantitativas revelaram a presença de substâncias fenólicas
 294 (Tabela 3), os quais são comumente associados a processos antioxidantes, e são conhecidos
 295 por serem anti-mutagênicos (ODIN, 1997; SARKAR et al., 1997; GIRI et al., 1998). As
 296 antocianinas e os flavonoides até então não haviam sido quantificadas em extratos de *A.*
 297 *pyrifolium* e *C. leprosum*, no entanto estes últimos já foram relatados em *C. leprosum*
 298 (FACUNDO et al., 1993).

299

300 **Tabela 3.** Dosagem de metabólitos no extrato aquoso de *A. pyrifolium* e *C. leprosum*.

Metabólito	Espécie / Concentração (µg/g)*	
	<i>A. pyrifolium</i>	<i>C. leprosum</i>
Polifenóis Extraíveis Totais	1036,11	3057,68
Flavonoides Amarelos	8,18	8,45
Antocianinas	0,62	0,27

301 *Dosagem em microgramas dos metabólitos por grama do extrato líquido

302

303 O elevado conteúdo de polifenóis nos extratos, cuja a composição apresenta
 304 possivelmente fenóis, taninos, depsídeos e depsídonas, provavelmente age em antagonismo a
 305 alguma substância tóxica presente nos extratos, fazendo que não se identifique um efeito
 306 dose-resposta linear sob o comprimento, matéria seca e índice mitótico dos tecidos expostos
 307 de *Allium cepa*.

308

309

310 CONCLUSÕES

311

312 Os extratos apresentaram efeitos tóxicos nas menores concentrações na maioria das
313 análises, contudo alterações sobre a concentração de 800 mg/L foram recorrentes, podendo
314 estar associado ao fator de dissociação de cada componente dos extratos, fazendo com que
315 tenham, em conjunto, efeitos distintos em cada concentração, não seguindo um modelo dose-
316 resposta. Estudos com extratos obtidos com solventes orgânicos e seus fracionamentos são
317 necessários para elucidar a citotoxicidade dos extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* e
318 *Combretum leprosum*.

319

320

321 REFERÊNCIAS

322

323 AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”,
324 Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.

325

326 AJASA, A. M. O. et al. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of
327 Nigeria. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 67–71, 2004.

328

329 AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of
330 five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p.
331 470–475, 2007.

332

333 ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE
334 Brasil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

335

336 ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the
337 selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid**
338 **Environments**, v. 62, pp. 127–142, 2005.

339

340 ANANTHI, R. et al. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root
341 extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 558–560,
342 2010.

343

344 BEN AMMAR, R. et al. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of
345 Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the
346 Phytochemical Composition. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 61–80, 2008.
347

348 BORGES, C. S. et al. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus*
349 *communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João
350 Pessoa, v. 5, n. 3, p. 15-20, 2011.
351

352 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de**
353 **sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
354 Agropecuária. Brasília, Mapa/ACS, p. 1-399, 2009.
355

356 CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN STADEN, J. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract
357 of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. **South African Journal of Botany**, v. 92,
358 p. 147–150, 2014.
359

360 DAMASCENO, M. M.; SOUTO, J. S.; SOUTO, P. C. Etnoconhecimento de espécies
361 forrageiras no semi-árido da Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 219-228,
362 2010.
363

364 FACUNDO, V. A. et al. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root
365 and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative
366 disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian**
367 **Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1309–1312, 2005.
368

369 FACUNDO, V. A. et al. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*.
370 **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 411–415, 1993.
371

372 FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102,
373 n. 1, p. 99–112, 1985.
374

375 FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food**
376 **colors**. New York: Academic Press, p. 181-207, 1982.
377

378 FRANCO, C. H. et al. Mutagenic potential of lettuce grown from irradiated seeds. **Scientia**
379 **Horticulturae**, v. 182, p. 27–30, 2015.
380
381 GIRI, A.; KHYNRIAM, D.; PRASAD, S. B. Vitamin C mediated protection on cisplatin
382 induced mutagenicity in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular**
383 **Mechanisms of Mutagenesis**, v. 421, n. 2, p. 139–148, 1998.
384
385 GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em**
386 **citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, p. 1-131, 2002.
387
388 HAIDER, S. et al. Heavy Metal Content in Some Therapeutically Important Medicinal Plants.
389 **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 119–127, 2004.
390
391 HORINOUCI, C. D. S. et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): Potential as an
392 antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1,
393 p. 311–319, 2013.
394
395 IVANOVA, D. et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants.
396 **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1–2, p. 145–150, 2005.
397
398 KAUR, P. et al. Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza*
399 *glabra* L. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 680–686, 2009.
400
401 KAUR, S. J.; GROVER, I. S.; KUMAR, S. Modulatory effects of a tannin fraction isolated
402 from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. **Food**
403 **and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 12, p. 1113–1119, 2000.
404
405 KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as antioxidants. **Mini Reviews in Medicinal**
406 **Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 365–374, 2006.
407
408 LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on
409 the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of**
410 **Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, 1997.
411

- 412 LEE, S. J. et al. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human
413 pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. **Cancer Letters**, v. 144, n. 1, p. 39–43,
414 1999.
- 415
- 416 LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of
417 petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of
418 *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.
- 419
- 420 LIMA, M. C. J. S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyriforme*
421 Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 320–324, 2010.
- 422
- 423 LIRA, S. R S. et al. Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol Extract of
424 *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 3, p. 213–215, 2002.
- 425
- 426 LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3b, 6b, 16b-
427 trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal**
428 **of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 59–64, 2012.
- 429
- 430 MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de
431 estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol.25, n.3, pp. 429-438, 2002.
- 432
- 433 MATSUMOTO, R. S. et al. Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L.
434 (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.
- 435
- 436 MEDEIROS, R. M. T. et al. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por
437 *Aspidosperma pyriforme*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24 (Supl.), p. 42–43, 2004.
- 438
- 439 MELO, J. I. M.; ANDRADE W. M. Boraginaceae s.l. A.Juss. em uma área de Caatinga da
440 ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, pp. 369-378, 2007.
- 441
- 442 MITAINE-OFFER, A. C. et al. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma indole* alkaloids.
443 **Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 142–145, 2002.
- 444
- 445 MORGAN, D. O. **The Cell Cycle: Principles of Control**. New Science Press, 2007.

446
447 MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite — the molecular
448 approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.
449
450 MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a
451 multidisciplinary approach: Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by
452 Alteños Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1–2, p. 123–131, 2000.
453
454 NOGUEIRA, P. C. N. et al. Plumeran alkaloids and glycosides from the seeds of
455 *Aspidosperma pyriforme* Mart. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p.
456 2108–2120, 2014.
457
458 NUNES, P. H. et al. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Die Pharmazie**, v. 64,
459 n. 1, p. 58–62, 2009.
460
461 ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of
462 antimutagenic action. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 386, n. 1, p.
463 39–67, 1997.
464
465 PARSONS, A. F.; WILLIAMS, D. A. J. Radical Cyclisation Reactions Leading to
466 Polycyclics Related to the Amaryllidaceae and *Erythrina* Alkaloids. **Tetrahedron**, v. 56, n.
467 37, p. 7217–7228, 8 set. 2000.
468
469 PAULINO, R. C. et al. Medicinal plants at the Sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte
470 State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 29–39, 2012.
471
472 PEREIRA, W. A.; SÁVIO, F. L.; BORÉM, A.; DIAS, D. C. F. DOS S. Influence of the seed
473 arrangement, number and size of soybean seed on seeling length test. **Revista Brasileira de**
474 **Sementes**, v. 31, n. 1, p. 113–121, 2009.
475
476 PÉREZ-CARREÓN, J. I et al. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula*
477 *officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology in**
478 **Vitro**, v. 16, n. 3, p. 253–258, 2002.
479

480 PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p.
481 1035–1042, 2000.

482

483 SARKAR, A. et al. Beta-carotene inhibits rat liver chromosomal aberrations and DNA chain
484 break after a single injection of diethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 7, p.
485 855–861, 1997.

486

487 SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food**
488 **Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

489

490 SILVA, D. S. B. S. et al. Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract
491 against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Revista Brasileira**
492 **de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 273–278, 2013.

493

494 TELES, C. B. G. et al. Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against
495 *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22,
496 n. 5, p. 936–942, 2011.

497

498 TRINDADE, R. C. P. et al. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma*
499 *pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1813–1816,
500 2008.

501

502 YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride
503 in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75,
504 n. 7, p. 934–938, 2009.

505

506 ZAMPINI, I. C. et al, Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic
507 extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 2, p. 330–
508 335, 2008.

509

510 ZHAI, S. et al. Comparative Inhibition of Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2 by
511 Flavonoids. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 10, p. 989–992, 1998.