



AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO DE *Echinodorus longiscapus* Arech.

Ana Paula Durand Coelho¹; Viviane Dal-Souto Frescura²; Ana Paula Mambri³; Aline Augusti Boligon⁴; Solange Bosio Tedesco⁵

1. Pós-Graduada do PPG Agrobiologia na Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS. Brasil. (apauladurand@yahoo.com.br)
 2. Pós-graduanda do PPG Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria
 3. Graduanda em Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria
 4. Pós-Graduanda PPG Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal de Santa Maria
 5. Professora Doutora do PPG Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria
- Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013**
-

RESUMO

No Brasil cerca de 80% da população utilizam como fonte de recurso terapêutico produtos de origem natural, principalmente plantas medicinais. A família Alismataceae reúne ervas aquáticas, parcialmente submersas, com folhas alternas espiraladas. Suas espécies são usadas como fonte de alimentos e de fitoterápicos, pois estudos fotoquímicos sobre a família encontraram entre os principais constituintes químicos, taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais. *Echinodorus longiscapus* Arech. é conhecida popularmente como erva-do-brejo e chapéu-de-couro, habita solos úmidos, bordas de lagoas, rios e banhados. O presente estudo visou avaliar os compostos fenólicos através da análise cromatográfica dos extratos, para obtenção de dados referentes à composição fitoquímica da espécie, bem como, avaliar o potencial genotóxico e antiproliferativo nos extratos de *E. longiscapus* em duas concentrações, através do sistema-teste *Allium cepa* L.. Para o teste foi coletado material vegetativo no habitat natural no município de Pinhal Grande, Rio Grande do Sul. Os extratos preparados, por infusão durante 15 min das folhas secas, em duas concentrações 6g. L⁻¹ e 24g.L⁻¹ e 2 controles, água (controle negativo) e o glifosato 15% (controle positivo), após amostras dos extratos foram analisadas por cromatográfica. A análise cromatográfica (CLAE-DAD) revelou a presença de flavonóides e ácidos fenólicos, sendo maiores teores de glicosídeo fenol e ácido gálico. Este estudo mostrou que os extratos apresentam potencial genotóxico e quando usado em elevada concentração, potencial antiproliferativo.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais, genotoxicidade, erva-do-brejo, *Allium cepa*.

EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS, GENOTOXIC POTENTIAL AND ANTIPROLIFERATIVE OF EXTRACTS OF *Echinodorus longiscapus* Arech.

ABSTRACT

In Brazil about 80% of the population use as a source of therapeutic use natural products, especially medicinal plants. The family Alismataceae meets aquatic herbs, partially submerged, with alternate leaves spiral. Its species are used as a source of food and herbal medicine because photochemical studies on the family found among the major chemical constituents, tannins, flavonoids, triterpenes, glycosides, equinodorosides, essences and minerals. *Echinodorus longiscapus* is popularly known as grass marsh and leather hat, inhabits moist soil, edges of lakes, rivers and wetlands. The present study aimed to evaluate the phenolic compounds by chromatographic analysis of the extracts to obtain data on the phytochemical composition of the species as well as assess the genotoxic and antiproliferative in extracts of *E. longiscapus* two concentrations of the test system *Allium cepa* L.. To test the plant material was collected in the wild in the municipality of Pinhal Grande, Rio Grande do Sul. The extracts prepared 15 min by infusion of dried leaves in two concentrations 6g. L⁻¹ e 24g.L⁻¹ and 2 controls, water (negative control) and glyphosate 15% (positive control), after samples were taken to extract the gas chromatographic analysis. Chromatographic analysis (HPLC-DAD) revealed the presence of flavonoids and phenolic acids. Since higher concentrations of phenol glycoside and gallic acid. This study showed that the extracts showed genotoxic potential and when used in high concentrations, antiproliferative potential.

KEYWORDS: Medicinal plants, genotoxicity, grass marsh, *Allium cepa*

INTRODUÇÃO

No Brasil cerca de 80% da população utilizam como fonte de recurso terapêutico produtos de origem natural, principalmente plantas medicinais (DI STASI, 1996; COELHO, 2013). São consideradas plantas medicinais as espécies vegetais que produzem algum princípio ativo utilizado para o tratamento de doenças, fornecendo material para tratamentos fitoterápicos através de folhas, flores, frutos, cascas, raízes entre outros, dos quais são preparados chás e outras formas de medicamentos (COELHO, 2013).

A família Alismataceae reúne ervas aquáticas, parcialmente submersas, com folhas alternas espiraladas (SOUZA & LORENZI, 2005). Suas espécies são usadas como fonte de alimentos e de fitoterápicos, pois estudos fotoquímicos sobre a família (LAINETTI & BRITO, 1980; MARTINS et al., 1995), encontraram entre os principais constituintes químicos, taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais.

REGO (1988), ao realizar um levantamento das espécies pertencentes à família Alismataceae no estado do Rio Grande do Sul, constatou que no estado a família é representada por *Echinodorus longiscapus* Arech., *E. grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Mich., entre outras. *E. longiscapus* é conhecida popularmente como erva-do-brejo e chapéu-de-couro, encontrada em solos úmidos, bordas de lagoas, rios e banhados (REGO, 1988).

A família Alismataceae apresenta entorno de 18 espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* no Brasil, sendo um dos gêneros mais representativos em

Alismataceae (COSTA et al., 2006). Entre as espécies do gênero *Echinodorus*, *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* Mich. possuem propriedades medicinais semelhantes e, popularmente, são denominadas de “chapéu de couro” (DUTRA et al., 2006). Na literatura não foram encontradas informações sobre as propriedades medicinais e uso de *E. longiscapus* na medicina popular. Porém, devido às semelhanças morfológicas da espécie com outras espécies do gênero *Echinodorus*, é possível que a população às confunda fazendo mal uso de suas propriedades, já que segundo FRESCURA (2012), o uso indiscriminado e sem controle pode causar mais danos à saúde do que benefícios, sendo importante o conhecimento dessas plantas, desde os níveis celulares, composição química, bem como ação sobre os organismos vivos.

O sistema teste *Allium cepa* L. serve como uma forma para identificar possíveis efeitos tóxicos, pela avaliação de genotoxicidade, citotoxicidade, toxicidade e atividade antimutagênica, servindo como bioindicador (COELHO, 2013). No decorrer dos anos sofreu adaptações que possibilitaram uma maior abrangência de utilização através da avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água e a avaliação dos efeitos de misturas complexas (SAMPAIO, 2012). O sistema é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade de plantas medicinais, pois suas raízes ficam em contato direto com a substância testada, o que permite a avaliação de diferentes concentrações.

O presente trabalho visou avaliar os compostos fenólicos através da análise cromatográfica dos extratos, para obtenção de dados referentes à composição fitoquímica da espécie, bem como, avaliar o potencial genotóxico e antiproliferativo nos extratos de *E. longiscapus* em duas concentrações, através do sistema-teste *Allium cepa*.

MATERIAL E METODOS

O material botânico constou de folhas de espécimes, coletadas a campo de *E. longiscapus*, na cidade de Pinhal Grande, Rio Grande do Sul. O material coletado foi devidamente identificado, segundo normas usuais em taxonomia (MORI et al., 1989) e parte incorporada ao herbário SMDB do Departamento de Biologia da UFSM.

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM, em ambiente não controlado.

Para o preparo dos extratos foram utilizadas folhas coletadas a campo, previamente secas a temperatura ambiente, os extratos foram preparados em duas concentrações: a usual de 6g.L⁻¹ e quatro vezes mais concentrado, 24g.L⁻¹. O preparo utilizado foi por infusão das folhas secas com água destilada após ebulição e deixadas por 15 minutos. Os extratos, após atingirem temperatura ambiente, foram utilizados para o enraizamento dos bulbos de *A. cepa* e parte analisados por cromatografia (CLAE-DAD).

Sistema teste vegetal “in vivo”: Ação dos extratos sobre a divisão celular das radículas de cebola

As células meristemáticas das radículas de cebola foram utilizadas como sistema teste para avaliar as alterações morfológicas e estruturais celulares e para determinar os índices mitóticos.

Na primeira etapa, foram colocados 4 grupos de 5 bulbos, para enraizar em

água destilada, os quais constituíram 4 tratamentos com 5 repetições cada. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T1- Controle negativo em água destilada; T2- Controle positivo em Glifosato 15%; T3- Extrato aquoso de folhas de *E. longiscapus* por infusão 6g.L^{-1} ; T4- Extrato aquoso de folhas de *E. longiscapus* por infusão 24g.L^{-1} . Os grupos foram submetidos aos tratamentos por 24 horas (Figura 1). Após, os bulbos foram recolocados em água destilada para respectivas recuperações dos possíveis danos ocorridos, por um período de 24 horas. As radículas dos bulbos de cada tratamento foram coletadas e colocadas em fixador 3:1 (etanol : ácido acético) por um período de 24 horas em temperatura ambiente, após colocadas em álcool 70% e armazenadas em refrigerador até o preparo das lâminas.



FIGURA 1- Bulbos de cebola em contato com os extratos aquosos por infusão de *Echinodorus longiscapus*.

O controle positivo utilizado foi o glifosato, pois comprovadamente induz alterações cromossômicas e inibe a divisão celular em células meristemáticas de *A. cepa* (SOUZA et al., 2010).

Na segunda etapa, foi realizada a análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola cultivadas nos extratos de plantas e nos controles (água e glifosato 15%). Radículas, foram coletadas com aproximadamente 5 mm, hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, após lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% e preparadas às lâminas pelo método de esmagamento (adaptada de GUERRA & SOUZA, 2002). As lâminas foram observadas ao microscópio LEICA 400X, e analisadas. Foi realizada a contagem total de células em divisão e calculado o índice mitótico (IM) baseando-se na porcentagem de células em divisão. Foram contadas 1000 células por bulbo, totalizando 5000 células/ tratamento.

Análise dos chás por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Em uma terceira etapa, amostras dos extratos foram levadas ao Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, onde foram realizadas as análises por CLAE-DAD.

Os componentes na mistura complexa (chá), obtido a partir de folhas de *E. longiscapus*, foram determinados pelo método de separação de substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Onde foram obtidos os compostos fenólicos e compostos flavonóides dos extratos aquosos da espécie.

Todos os produtos químicos foram de grau analítico. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com o sistema de CLAE (Shimadzu,

Kyoto, Japão), Auto Sampler Prominence (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT bombas alternativas ligadas ao desgaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, UV-VIS DAD detector por arranjo de diodos SPD-M20A e software LC solution SP1 1,22. As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente utilizando coluna C₁₈ (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5µm de diâmetro. A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), onde o gradiente de composição foi: 5% de B até 2 min e alterado para se obter 25%, 40%, 50%, 60% e 100% de B em 10, 20, 30, 40, 50 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Sabir et al. (2012) com ligeiras modificações. As infusões das folhas de *E. longiscapus* foram analisadas em ambas as concentrações. Foi investigado a presença de cinco compostos de anti-oxidantes, sendo eles, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e rutina.

A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção no UV com os dos padrões comerciais. A taxa de fluxo foi de 0,7 mL.min⁻¹, volume de injeção de 50 µL e o comprimento de onda de 254 nm para ácido gálico, 325 nm para ácidos cafeico e clorogênico, e 365 nm para a quercetina e rutina.

As amostras e fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultrassons antes da utilização. As soluções de referência de normalização foram preparadas em fase móvel para CLAE em uma gama de concentrações de 0,020-0,200 mg.mL⁻¹ para a quercetina e rutina e 0,050-0,250 mg.mL⁻¹ para ácido gálico, ácidos cafeico e clorogênico.

Os picos de cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 11503x + 1376,8$ ($r = 0,9998$), ácido clorogênico: $Y = 10955x + 1274,3$ ($r = 0,9995$), ácido cafeico: $Y = 12764x + 1350,7$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 13721 + 1168,4$ ($r = 0,9997$) e quercetina: $Y = 13495x + 1092,6$ ($r = 0,9999$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

Análise estatística

Foi utilizada a análise estatística para a comparação entre os valores dos índices mitóticos e entre os valores das alterações cromossômicas, pelo teste Qui-quadrado (χ^2), com o auxílio do programa BIOSTAT 5.0[®] (AYRES, 2007). E para os resultados do CLAE pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar os efeitos dos extratos aquosos de *E. longiscapus* foi utilizado o sistema-teste *A. cepa*, o qual é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004; FACHINETTO et al., 2007).

Os resultados obtidos mostraram que os índices mitóticos encontrados foram de: 3,38% para o controle negativo (água destilada), 0,16% para o controle positivo (glifosato 15%), 5,14% para *E. longiscapus* 6g.L⁻¹ e 0,24% para *E. longiscapus* 24g.L⁻¹ (Tabela 1).

TABELA 1– Número de células em interfase, número de células em divisão e índice mitótico.

Tratamento	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
T1-Controle negativo	5000	4831	169	3,38 ^b
T2-Controle positivo	5000	4992	8	0,16 ^d
T3- <i>E. longiscapus</i> 6 g.L ⁻¹	5000	4743	257	5,14 ^a
T4- <i>E. longiscapus</i> 24g.L ⁻¹	5000	4988	12	0,24 ^c

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de χ^2 a nível de 5%.

O controle negativo (água destilada) diferiu do controle positivo (glifosato 15%) no número de divisões celulares, indicando efeito antiproliferativo do glifosato na concentração 15% ($\chi^2 = 149.085$). O controle negativo diferiu do extrato de *E. longiscapus* 6g.L⁻¹ ($\chi^2 = 18.987$) e do extrato de *E. longiscapus* 24g.L⁻¹ ($\chi^2 = 138.693$), demonstrando efeito antiproliferativo para o extrato na concentração de 24g.L⁻¹ e efeito indutor da divisão celular para a concentração de 6g.L⁻¹ (Tabela 1). Assim, fica evidente que em concentrações elevadas os extratos de *E. longiscapus* possuem potencial antiproliferativo.

Ainda, os extratos diferiram entre si, $\chi^2 = 229.310$, demonstrando que com o aumento da concentração e consequentemente o aumento nos constituintes fitoquímicos (Tabela 3), ocorreu um efeito antiproliferativo na maior concentração. É possível que a alta concentração de alguns compostos tenha causado esse efeito (inibitório ou estimulatório) no ciclo celular (FACHINETTO et al., 2007).

O efeito antiproliferativo foi estudado por TEDESCO (2012), comparando três concentrações (5, 15 e 30g.L⁻¹) do extrato aquoso de *Mentha pulegium* L. sobre o ciclo celular de *A. cepa*, observando que o aumento da inibição da divisão celular foi gradativo, conforme o aumento da concentração do extrato. O mesmo resultado foi encontrado por LUBINI et al. (2008) ao estudar espécies do gênero *Psychotria* (*P. myriantha* Müll. Arg. e *P. leiocarpa* Cham. & Schltdl.) e por BAGATINI et al. (2009) em estudo com *Solidago microglossa* DC, as quais apresentaram maior potencial antiproliferativo na maior concentração dos extratos.

O efeito genotóxico foi avaliado pela quantificação e diferenciação das células normais de alterações cromossômicas, tais como, pontes, quebras e cromossomos perdidos (Figura 2). Analisando os resultados obtidos, houve uma diferença significativa na comparação dos valores das alterações cromossômicas entre o controle negativo (água) com 3 alterações cromossômicas e o controle positivo (glifosato 15%) com 0 alterações ($\chi^2 = 146.842$). O controle positivo não apresentou alterações, devido ao número muito pequeno de células em divisão celular (8/5000), enquanto que o controle negativo apresentou 3, o que pode ser resultado de alteração natural, pois apresentou 169 células em divisão/5000 células analisadas (Tabela 2).

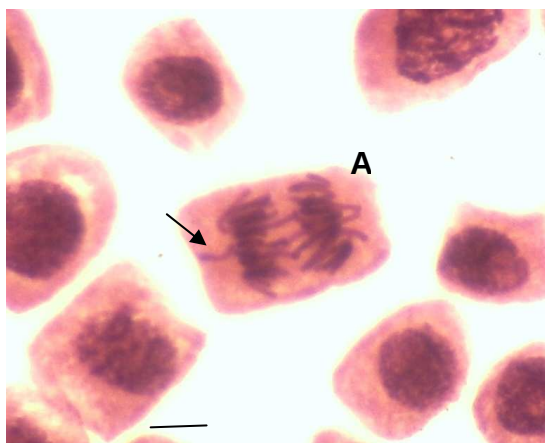


FIGURA 2- Células de *Allium cepa*: A- Célula com ponte anafásica e cromossomo perdido (seta) e demais células em interfase do tratamento *E. longiscapus* 6g.L⁻¹. 10 µm.

TABELA 2 – Número de células em divisão, número e tipos de alterações celulares e número total de células irregulares.

Tratamento	Células em divisão	Alterações cromossômicas		
		Pontes	Quebras e cromossomos perdidos	Total de células irregulares
T1- Controle negativo	169	1	2	3 ^b
T2- Controle positivo	8	-	-	0 ^c
T3- <i>E.longiscapus</i> 6g.L ⁻¹	257	18	6	24 ^a
T4- <i>E.longiscapus</i> 24g.L ⁻¹	12	-	-	0 ^c

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de χ^2 a nível de 5%.

Os extratos aquosos, em ambas as concentrações, tiveram seus números de alterações comparados com os do controle negativo e o resultado para a concentração de 6g.L⁻¹ (24 alterações) foi $\chi^2 = 33.379$ e para a concentração de 24g.L⁻¹ (0 alterações) foi $\chi^2 = 136.702$, havendo diferença significativa nos dois tratamentos, mesmo quando comparando os tratamentos entre si ($\chi^2 = 240.275$), indicando um maior potencial genotóxico para a menor concentração. O controle positivo (glifosato 15%) não diferiu do tratamento em maior concentração, 24g.L⁻¹ (Tabela 2). Então, com o aumento da concentração do extrato ocorre à inibição da divisão celular e com isso, há menor número de alterações durante a mitose, semelhante ao que ocorreu com o controle positivo (glifosato 15%).

Estudos com substâncias em alta concentração também dificultaram a observação de células irregulares e quando utilizadas em menor concentração foi possível avaliar o potencial genotóxico das mesmas, como o estudo realizado com o glifosato por KRÜGER (2009), em que as concentrações de 20µL.L⁻¹, 15 µL.L⁻¹,

10µL.L⁻¹ e 5 µL.L⁻¹ inibiram a divisão celular e não foi possível observar alterações celulares, no entanto, quando foram utilizadas concentrações bem inferiores (1 µL.L⁻¹, 2 µL.L⁻¹, 3 µL.L⁻¹ e 4 µL.L⁻¹) foi possível observar número significativo de alterações cromossômicas.

Espécies medicinais analisadas pelo sistema-teste A. cepa foram consideradas genotóxicas, como por exemplo, *P. myrianta* (LUBINI et al., 2008), *P. birotula* Smith & Downs (FRESCURA, 2012).

Os resultados para a análise por CLAE das infusões das folhas de *E. longiscapus* revelou a presença do ácido gálico (t_R = 8,56 min; pico 1), ácido clorogênico (t_R = 18,13 min; pico 2), ácido cafeico (t_R= 21,74 min , pico 3), glicosídeo fenol não identificado (t_R = 27,91 min; pico 4), rutina (t_R= 31,68 min; pico 5) (Figura 3 e Tabela 3). A análise CLAE revelou que os flavonóides e ácidos fenólicos estão presentes nos extratos de *E. longiscapus*.

TABELA 3- Compostos fenólicos e flavonóides de *E. longiscapus*.

Compostos	<i>E. longiscapus</i>			
	mg.g ⁻¹		%	
	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹	24g.L ⁻¹	6g.L ⁻¹
Ácido gálico	81.06 ± 0.03 ^a	20.19 ± 0.02 ^a	8,10	2,01
Ácido clorogênico	14,95 ± 0,01 ^b	3.74 ± 0.02 ^b	1,49	0,25
Ácido cafeico	36,73 ± 0,04 ^c	9.18 ± 0.01 ^c	3,67	0,91
Glicosídeo fenol*	87,54 ± 0,01 ^d	21.89 ± 0.05 ^a	8,74	2,19
Rutina	41,12 ± 0,03 ^e	10.27 ± 0.04 ^c	4,11	1,02
Flavonóide glicosídeo [#]	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a p <0,005. * Quantificado como ácido cafeico, # quantificado como quercetina.

O ácido gálico e o glicosídeo fenol foram os compostos encontrados em maior quantidade na espécie, sendo, 8,10% e 8,74% respectivamente (Tabela 3).

Em estudo desenvolvido por COELHO (2013) foi realizada análise cromatográfica (CLAE-DAD) dos extratos aquosos de *E. grandiflorus*, de folhas coletadas a campo e comercializadas, constatando-se a presença de ácidos fenólicos e flavonóides nos extratos, sendo, ácido cafeico, flavonóide glicosídeo e glicosídeo fenol os compostos encontrados em maiores teores.

De acordo com LOPES et al. (2012), estudos sobre a composição química de folhas das espécies do gênero *Echinodorus* sugerem um conteúdo químico constituído por ácido trans-aconítico, glicosilflavonas e ácido hidroxitartárico (SCHNITZLER et al., 2007), sesquiterpenos (PIMENTA et al., 2006) e, principalmente, diterpenos dos tipos clerodano, cembrano e labdano (MANN &

HARTMANN, 1993; TANAKA et al., 1997; COSTA et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2000a; b),

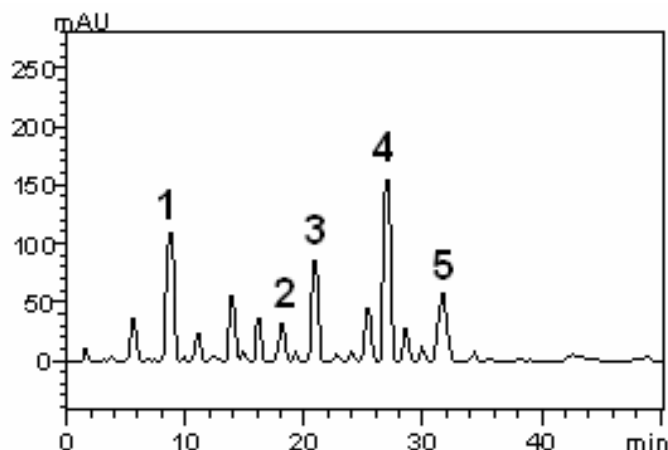


FIGURA 3- Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão das folhas de *Echinodorus longiscapus*, detecção UV foi a 325nm. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), glicosídeo fenol não identificado (pico 4), rutina (pico 5). Condições cromatográficas são descritos na seção de Métodos.

CONCLUSÕES

A espécie *E. longiscapus* apresentou potencial antiproliferativo com o aumento da concentração dos extratos. A espécie pode ser considerada genotóxica, pois apresentou elevado número de alterações cromossômicas na concentração de 6g.L⁻¹.

A análise cromatográfica (CLAE-DAD) revelou a presença de flavonóides e ácidos fenólicos, sendo maiores teores de glicosídeo fenol e ácido gálico.

REFERÊNCIAS

AYRES, M. Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil **Mamirauá**, Brasília: CNPq, 290p. 2007.

BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S. B. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 632-636, 2009.

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

COELHO, A. P. D. Potencial genotóxico e antiproliferativo dos extratos de *Echinodorus grandiflorus* e *Sagittaria montevidensis* (Alismataceae). 56f. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.

COSTA, Y. J.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismatales) with chromosomal banding and 45S DNAr FISH. **Plant Systematics and Evol.** 257:119-127. 2006.

COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v.50, p.117-22, 1999.

DI STASI, L. C. L. C. (Org.). **Planta medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 1996.

DUTRA, R. C.; TAVARES, Z. C.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(4): 469-474. 2006.

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

FRESCURA, V. D. S. Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Briton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae). 2012. 74f. **Dissertação** (Mestrado em Agrobiologia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2012.

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

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.375-7, 2000a.

KOBAYASHI, J. SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen- containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Letters**, v.41, p.2939-43, 2000b.

KRÜGER, R. A. Análise de toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. 58f. **Dissertação** (Mestrado em Qualidade Ambiental) Centro Universitário Feevale. Novo Hamburgo, RS. 2009.

LAINETTI, R.; BRITO, N.R.S. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Ediouro, 120p. 1980.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J.M.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, Bratislava, v. 63, n. 5, p. 647-651, out. 2008.

LOPES, G.C.; SANTOS, P.V.P.; DICIAULA, M.C.; BLAINSKI, A.; GUTIERRE, M.A.M.; MELLO, J.C.P. Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido o-hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus* **Rev. bras. plantas med.** vol.14 no.3 Botucatu 2012.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica**, v.59, p.465-6, 1993.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa : UFV, 220p. 1995.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADINI, L. Manual de manejo do herbário fanerogâmico, Ilhéus: **Ceplac**, 104 p. 1989.

PIMENTA, D.S.;FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.4, p.623-8, 2006.

REGO, S. C. A. Alismataceae no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 128 p. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1988.

SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; HAMID, A.; KHAN, M. Q.; ATHAYDE, M.L. SANTOS, D.B.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, 741-747, 2012.

SAMPAIO, F.A. Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) imidazolidina-2,4-diona (PT -31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2012.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Trans-aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. aureus, a Brazilian medicinal plant. **Rev. bras. farmacogn.** vol.17 no.2 João Pessoa Apr./June 2007.

SILVA, C.R., MONTEIRO, M.R., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A., BEZERRA, R.J.A.C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Rev Bras Farmacogn**,v.14, p. 1-3. 2004.

SOUZA, L. F.; IV LAUGHINGHOUSE, H. D., PASTORI, P.; TEDESCO, M. T.; KUHN, A. W.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies** 67: 871-877. 2010.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v.44, n.8, p.1547-9, 1997.

TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; AGUIAR, A. R.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S.B. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1913, 2012.