

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BOLDO SOBRE A GERMINAÇÃO E ÍNDICE MITÓTICO DE *ALLIUM CEPA* L.

J.R.V. Iganci, V.L. Bobrowski, G. Heiden, V.C. Stein, B.H.G. Rocha

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia e Genética, CP 354, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: vera.bobrowski@ufpel.tche.br

RESUMO

Agentes químicos produzidos em algumas plantas podem provocar alterações no desenvolvimento de outras plantas ou até mesmo de outros organismos. Ensaios laboratoriais podem demonstrar os resultados destas interações, porém, sem considerar a ação do ambiente. Com este trabalho objetivou-se identificar a influência de extratos vegetais de 3 espécies conhecidas no Brasil popularmente como boldo sobre o desenvolvimento de *Allium cepa*. Os bioensaios foram conduzidos em germinador a 25° C, com extrato aquoso obtido por infusão de folhas frescas na concentração de 30 g.L⁻¹ e água destilada como controle. Os testes de primeira contagem e germinação, que avaliam efeito alelopático foram realizados com 4 repetições de 50 sementes. Para determinação da citotoxicidade, através do índice mitótico (IM) foram contadas pela técnica de varredura 2.400 células por extrato. Os bioensaios realizados revelaram que os extratos vegetais interferiram sobre a germinação e sobre a divisão celular em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*. Sementes expostas ao extrato de *Vernonia condensata* apresentaram as maiores divergências em relação ao grupo controle.

PALAVRAS-CHAVE: Divisão celular, alelopatia, *Vernonia condensata*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthusamboinicus*.

ABSTRACT

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF THE "BOLDO" SPECIES ON THE GERMINATION AND MITOTIC INDEX OF *ALLIUM CEPA* L. Chemical agents produced by some plants may cause changes on the development of other plants and organisms. Laboratory assays can show the results of these interactions, however, without considering the environmental action. The aim of this work was to identify the influence of plant extracts from 3 species of plants usually known in Brazil as "boldo" on the development of *Allium cepa* seeds. Bioassays were carried out in a germinator at 25° C with aqueous extract obtained by infusion of the fresh leaves in concentration of 30 g.L⁻¹ and distilled water as a control. The first score and germination tests that evaluated allelopathic effect were done with 4 repetitions of 50 seeds/extract. For the cytotoxicity assay, using mitotic index (MI), 2,400 cells/extract were scored through the scan technique. The bioassay revealed that the plant extracts act on the *A. cepa* germination and root-tip cell division. Seeds exposed to *Vernonia condensata* extract showed the highest divergence when compared with the control group.

KEY WORDS: Cell division, allelopathy, *Vernonia condensata*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthusamboinicus*.

INTRODUÇÃO

Algumas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo o processo germinativo bem como o processo de divisão celular. Estes compostos são conhecidos como alelopáticos. O termo alelopatia refere-se à capacidade que as plantas têm de interferir no desenvolvimento de outras plantas, por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou, quase sempre, no solo (MEDEIROS, 1990; FERREIRA & BORGHETTI, 2004). A ação

alelopática se dá através do efeito destas substâncias aliado às condições ambientais. A alelopatia pode ser um fator determinante do sucesso ou insucesso no cultivo de plantas (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado a identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN *et al.*, 2003).

A ação visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças

anteriores. Assim, os estudos referentes ao efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de processos ocorridos a nível molecular e celular inicialmente (FERREIRA & AQUILA, 2000; FERREIRA & BORGHETTI, 2004). A maioria dos estudos em alelopatia refere-se apenas ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas (PIRES *et al.*, 2001) e genéticas.

Compostos químicos que muitas vezes apresentam efeito alelopático são também utilizados na medicina popular na cura de doenças, onde a preparação e uso adequado trazem benefícios, porém seus efeitos genotóxicos e mutagênicos necessitam de melhores investigações (NUNES & ARAÚJO, 2003).

Muitas pessoas acreditam erroneamente que cultivam boldo-do-chile (*Peumus boldus*), porém, essa planta é muito rara no Brasil. Outras plantas são também conhecidas como boldo, principalmente, o boldo-da-terra (*Plectranthus barbatus* - Lamiaceae), o boldo-miúdo (*Plectranthus amboinicus* - Lamiaceae) e o boldo-baiano (*Vernonia condensata* - Asteraceae), que apresentam diferentes efeitos colaterais e indicações, apesar de serem utilizados como a mesma planta em diferentes regiões (BLANCO, 2005).

Os princípios ativos constituintes divergem entre estas espécies como, por exemplo, o boldo miúdo apresenta como principais o timol, o carvacrol e o cariofileno, enquanto que o boldo baiano apresenta ácido clorogênico, saponinas, glicosídeo cardiotônico (vernonina), lactonas sesquiterpênicas, flavonóides e o boldo-da-terra é rico em guaieno e fenchona, terpenos (barbatusina, ciclobarbatusina, cariocol), triterpenóides e esteróides (CIAGRI, 2005).

Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito do extrato aquoso de 3 diferentes espécimes conhecidos popularmente como boldo sobre o desenvolvimento inicial e índice mitótico de células meristemáticas radiculares de cebola, com o intuito de identificar a existência de efeito alelopático destes extratos sobre o desenvolvimento de *Allium cepa* (cebola).

MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas frescas de *P. barbatus*, *P. amboinicus* e *V. condensata* foram coletadas para o preparo do extrato aquoso através de infusão, onde foram utilizadas 30 g de folhas por litro de água destilada para cada um dos extratos.

As sementes de cebola foram pré-embebidas durante 48h em gerbox contendo papel germiteste umedecido com água destilada e mantidos a $25 \pm 1^\circ$ C. Após, as sementes foram transferidas para gerboxes contendo papel embebido nos diferentes extratos,

exceto a amostra controle, que permaneceu em água destilada.

A primeira contagem foi realizada aos seis dias e o teste de germinabilidade aos 12 (BRASIL, 1992). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram radícula com no mínimo 50% do tamanho da semente (FERREIRA & AQUILA, 2000). A porcentagem de germinação na primeira contagem e germinabilidade (G) foi calculada com o uso da seguinte fórmula:

$$G = (N/A) \times 100$$

sendo que N = número total de sementes germinadas; A = número total de sementes colocadas para germinar.

Para análise do índice mitótico, as radículas foram coletadas aos seis dias após o teste de primeira contagem e preparadas através da técnica de esmagamento (GUERRA & SOUZA, 2002), fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial) por duas horas, hidrolisadas em HCl 5N durante quinze minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 5%. As células foram analisadas por varredura, em microscópio ótico com aumento de 400X sendo analisadas 2.400 células para cada um dos tratamentos, observando-se o número de células em cada fase da mitose. O índice mitótico (IM) foi obtido através da seguinte equação (PIRES *et al.*, 2001):

$$IM = (m/T) \times 100$$

sendo que m = número de células em mitose; T = número total de células.

Para análise de germinação o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições onde cada repetição era composta por quatro amostras com 50 sementes e a análise da variação pelo pacote estatístico Sanest. A comparação das médias foi realizada através do teste de Duncan com 5% de probabilidade (BEIGUELMAN, 2002). Para comparação de médias do índice mitótico os tratamentos foram comparados pelo teste de qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação aos seis dias o grupo controle apresentou 47% de germinação enquanto que o tratamento com *P. barbatus* apresentou 61%, com *P. amboinicus* 46% e com *V. condensata* 65% de germinação, as diferenças observadas entre os tratamentos não foram estatisticamente significativas.

No entanto no teste de germinação podemos verificar que entre os resultados obtidos houve diferença significativa ($p < 0,05$), onde o tratamento controle apresentou 66% de germinação, o tratamento com *P. barbatus* apresentou 71%, com *P. amboinicus* 55% e com *V. condensata* 76% de germinação (Fig. 1). Através deste teste podemos observar que o extrato de *P. amboinicus* causou um retardo na germinação de cebola, enquanto que o extrato de *V. condensata* causou uma aceleração no processo quando comparados com o controle.

Estes resultados diferem da citação de FERREIRA & BORGHETTI (2004) onde os autores citam que muitas vezes o efeito alelopático não é sobre a germinabilidade (percentual final de germinação no tempo), mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo. Como podemos observar para estes extratos o teste de primeira contagem não demonstrou ser afetado pelos compostos das plantas, mas o seu efeito foi detectado sobre a germinação final não só retardando o processo como descreve LABOURIAU (1983), mas também o ativando. Estes resultados estão de acordo CHON *et al.* (2005) que descreve alelopátia como interações químicas entre plantas tanto estimulatórias quanto inibitórias.

KATHIRESAN (2000) observou redução no desenvolvimento de plantas aquáticas com o uso de pó de *C. amboinicus* em concentração a partir de 10 g.L^{-1} , atribuindo aos princípios ativos alfa-humuleno, carvacrol, timol, alfa-pineno e alfa-terpino o efeito tóxico da planta, resultado similar ao observado na figura 1 com concentração de 30 g.L^{-1} .

Segundo FERREIRA & ÁQUILA (2000), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto, germina ou não germina. Nesse contexto, podemos verificar que as sementes de cebola foram sensíveis ao extrato de duas espécies de plantas co-

nhecidas popularmente como boldo, sofrendo efeito alelopático.

De acordo CARVALHO *et al.* (1996) estudos como este sobre substâncias alelopáticas e a identificação das plantas que possuem princípios ativos capazes de causar algum efeito é assunto de grande importância, tanto na utilização de extratos capazes de inibir plantas daninhas na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais, quando na determinação de práticas culturais e de manejos mais adequados que evitem a interferência destas substâncias no crescimento de outras (GATTI *et al.*, 2004).

Outro efeito causado por substâncias alelopáticas é o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Compostos químicos que muitas vezes apresentam efeito alelopático também podem ter efeitos genotóxicos e mutagênicos (NUNES & ARAÚJO, 2003). Os extratos testados neste experimento produziram efeito sobre o processo de divisão celular da cebola, mas não foram detectados efeitos citotóxico ou genotóxico e sim um aumento no índice de divisão celular significativo quando comparado ao controle.

O índice mitótico observado foi de 29,20% para as radículas tratadas com *P. barbatus*, 20,95% para aquelas tratadas com *P. amboinicus*, 39,83% para as tratadas com *V. condensata* e 5,2% na amostra controle, como são mostrados na Figura 2.

Segundo RODRIGUES *et al.* (1992), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas, porém os efeitos observados neste trabalho parecem indicar que não só a inibição, mas também a aceleração pode interferir no processo de divisão celular, pois o aumento no índice de divisão parece corroborar os dados de germinabilidade das sementes de cebola.

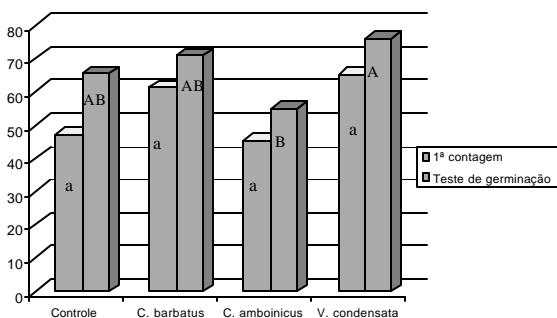


Fig. 1 - Avaliação do percentual de sementes germinadas nos teste de primeira contagem e germinabilidade. Letras distintas entre médias do mesmo teste indicam que estas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

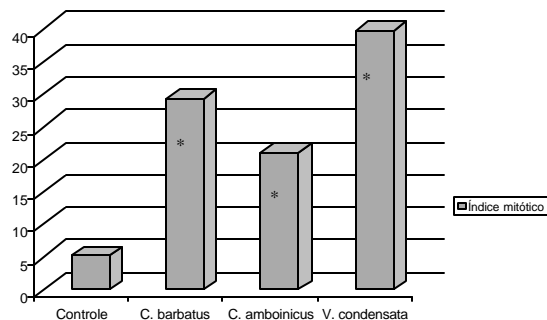


Fig. 2 - Índice de divisão mitótica das células de cebola tratadas com extratos de espécies conhecidas popularmente como boldo. Médias com * diferem estatisticamente do controle pelo teste de $\chi^2 < 0,01$.

O índice de divisão mitótica apresentou diferença entre os tratamentos, o que pode indicar uma distinta ação fisiológica de cada um dos extratos aplicados à cebola. Segundo FERREIRA & BORGHETTI (2004), a emergência da plântula e o seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese do indivíduo.

Algumas células tratadas com extrato de *P. barbatus* apresentaram anomalias nucleares do tipo aneugênese durante a divisão mitótica, porém, os dados não foram avaliados estatisticamente. A interferência na divisão celular causada pela ação do extrato com efeito sobre o desenvolvimento do sistema radicular provavelmente representa um dos mecanismos de ação do extrato sobre o desenvolvimento da planta teste (PIRES et al., 2001).

Através dos dados apresentados pode-se concluir que os extratos das diferentes espécies de boldo utilizados influenciaram na germinação e causaram uma variação considerável no índice mitótico de cebola, apresentando assim efeito alelopático acelerando o desenvolvimento inicial das plântulas, além disto a cebola mostrou ser um biomonitor sensível a estes extratos.

REFERÊNCIAS

- BEIGUELMAN, B. *Curso prático de bioestatística*. 5.ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2002. 274p.
- BLANCO, R.A. Boldo? Qual boldo? Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/ervas.html>>. Acesso em: 19 jun. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: MARA, 1992. 365p.
- CARVALHO, G.J.; ANDRADE, L.A.B.; GOMIDE, M.; FIGUEIREDO, P.A.M. Potencialidades alelopáticas de folhas verdes + ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de matéria seca, na germinação de sementes de alface. *Ciências*, v.5, n.2, p.19-24, 1996.
- CIAGRI. USP. Plantas medicinais. Disponível em: <<http://ci66.ciagri.usp.br/pm/index.asp>>. Acesso em: 16 jun. 2005
- CHON, S.-U.; JANG, H.-G.; KIM, D.-K.; KIM, Y.-M.; BOO, H.-O.; KIM, Y.-J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, v.106, p.309-317, 2005.
- FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.175-204, 2000. Suplemento.
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.
- GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G. DE A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasílica*, v.18, n.3, p.459-472, 2004.
- GUERRA, M. & SOUZA, M.J. *Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana*. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.
- KATHIRESAN, R.M. Allelopathic potential of native plants against water hyacinth. *Crop Protection*, v.19, p.705-708, 2000.
- LABOURIAU, L.G. *A germinação de sementes*. Washington: OEA, 1983. 174p.
- MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia: importância e suas aplicações. *Horti Sul*, v.1, n.3, p.27-32, 1990.
- NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. *Química Nova*, v.26, n.3, p.331-334, 2003.
- NUNES, A.P.M. & ARAUJO, A.C. Ausência de genotoxicidade de esteviosídeo em *E. coli*. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 10, 2003, Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro, 2003. p.15.
- PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, n.1, p.55-65, 2001.
- RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. *Alelopatia em plantas forrageiras*. Jaboticabal: FCAVJ-UNESP/FUNEP, 1992. 18p.

Recebi em 26/12/05

Aceito em 3/3/06