

1
2
3
4
5
6 **Fitotoxidez do Extrato Aquoso de *Schinus molle* L. e de *Schinus terebinthifolius* Raddi**
7 **(Anacardiaceae)**
8
9
10
11
12

13 ¹Tathiane Reinaldo¹, Ângela Pawlowski², Eliane Kaltchuk-Santos³, Geraldo Luiz Gonçalves
14 Soares⁴
15
16
17
18
19
20
21

22 Artigo redigido conforme normas do periódico **Acta Botanica Brasilica**
23
24
25
26
27
28
29

¹ Iniciação científica, Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Av. Bento Gonçalves 9500, 01501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

² Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

³ Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

⁴ Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, geraldo.soares@ufrgs.br

30 **RESUMO:** (Fitotoxidez do extrato aquoso de *Schinus molle* L. e de *Schinus terebinthifolius*
31 Raddi (Anacardiaceae)). *Schinus* L. (Anacardiaceae) compreende espécies nativas, tais como *Schinus*
32 *molle* e *S. terebinthifolius*, ambas consideradas pioneiras importantes de áreas florestais. O gênero é
33 marcado pela produção de diversos metabólitos secundários a qual pode estar relacionada às
34 características ecológicas dessas espécies. O potencial alelopático dos extratos aquosos de folhas de *S.*
35 *terebinthifolius* e *S. molle* foi avaliado sobre a germinação e o crescimento de plântulas em *Lactuca sativa*
36 L. e *Allium cepa* L., sendo também testada sua ação citotóxica sobre células do meristema radicial das
37 espécies-alvo. Índices mitóticos e metafásicos, bem como anormalidades cromossômicas foram avaliados
38 em todos os tratamentos. Adicionalmente, também foi investigada a ação dos extratos aquosos de ambas
39 as espécies sobre a integridade de membranas celulares nas duas espécies-alvo. Não foram observadas
40 reduções significativas nas taxas de germinação e de crescimento quando comparadas ao grupo controle.
41 O extrato aquoso de *S. molle* e de *S. terebinthifolius* resultaram numa redução significativa nos IMs de
42 células meristemáticas de alface (38,32% e 41,22%, respectivamente). Não foi detectado efeito danoso às
43 membranas nas plântulas expostas aos extratos aquosos estudados.

44
45 Palavras-chave: alelopatia, germinação, crescimento, citotoxicidade, genotoxicidade

46
47 **ABSTRACT:** (Phytotoxicity of the aqueous extracts of *Schinus molle* L. and *Schinus*
48 *terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)). *Schinus* L. (Anacardiaceae) includes native species such as
49 *Schinus molle* and *S. terebinthifolius*, both considered important pioneers of forest areas. The genus is
50 characterized by the production of several secondary metabolites which can be related to the ecology of
51 these species. The allelopathic potential of the aqueous extracts of leaves of *S. terebinthifolius* and *S.*
52 *molle* was evaluated on germination and seedling growth on *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L., and
53 also tested their cytotoxic action on cell of the root meristems of the target species. Mitotic and
54 metaphasic indexes, as well as chromosomal abnormalities were evaluated in all treatments.
55 Additionally, we also investigated the action of the aqueous extracts of both species on the integrity of
56 cell membranes in the two target species. Significant reductions in rates of germination and growth were
57 not observed when compared to the control group. *Schinus molle* and *S. terebinthifolius* aqueous extracts
58 resulted in a significant reduction in the IMs in lettuce (38,32% and 41,22%, respectively). Harmful effect
59 on membranes in seedlings exposed to aqueous extracts studied was not detected.

60
61 Key words: allelopathy, germination, growth, cytotoxicity, genotoxicity

62
63
64

65 **Introdução**

66 O termo alelopatia se refere a todos os tipos de interação química entre as plantas e
67 microorganismos através da produção de metabólitos secundários liberados no ambiente. A maioria
68 destas substâncias (denominadas aleloquímicos) está fortemente relacionada aos processos de sinalização
69 entre espécies que podem estimular ou inibir o crescimento e o desenvolvimento da planta (Harborne
70 1993).

71 *Schinus* L. (Anacardiaceae) inclui espécies arbóreas ou arbustivas lenhosas nativas do continente
72 americano. Dentre as espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul estão *Schinus molle* L. e *Schinus*
73 *terebinthifolius* Raddi. Estas espécies são amplamente cultivadas sendo empregadas como ornamentais
74 devido ao seu porte e beleza. Ambas são pioneiras importantes na recuperação e expansão de áreas
75 florestais, pois conseguem se desenvolver em ambientes intensamente degradados. Devido ao seu alto
76 poder de adaptação e dispersão, *S. terebinthifolius* é considerada uma pioneira agressiva. Na Flórida, esta
77 espécie é considerada uma exótica invasiva de ecossistemas naturais. Estudos revelaram o poder
78 alelopático de seu extrato aquoso sobre duas espécies nativas *Bidens alba* (L.) DC. e *Rivina humilis* L.
79 (Morgan & Overholt 2005).

80 Diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas a estas plantas. Estudos demonstram as
81 atividades antifúngica (Santos *et al.* 2010), antipirética, anti-inflamatória e analgésica (Erazo *et al.* 2000)
82 de espécies de *Schinus*. Este gênero é caracterizado pela produção de exsudato resinoso e de diversos
83 metabólitos secundários. Estudos fitoquímicos e biológicos efetuados descrevem a ocorrência de
84 derivados fenólicos, dentre os quais se destacam os taninos e os catecóis alquenilados. Essas plantas são
85 bastante aromáticas e podem produzir um óleo volátil rico em terpenoides, dentre os quais preponderam
86 mono e sesquiterpenoides (Pawlowski *et al.* 2012, Ceruks *et al.* 2007, Damasceno *et al.* 2007). A
87 presença destes compostos pode estar relacionada às características ecológicas destas espécies tornando-
88 as potencialmente invasoras de ecossistemas naturais.

89 Aleloquímicos têm sido sugeridos como alternativa ao uso de agrotóxicos, o que demanda um
90 aprofundamento em estudos sobre a interação química entre as espécies vegetais. No entanto, a maioria
91 das pesquisas no âmbito da alelopatia refere-se apenas ao efeito de um aleloquímico sobre a germinação e
92 o crescimento inicial da planta-alvo, não considerando os eventos celulares relacionados às mudanças
93 fisiológicas no sistema da planta (Pawlowski *et al.* 2012, Pires *et al.* 2001, Ferreira & Aquila 2000).

94 O presente trabalho visou avaliar o potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Schinus*
95 *terebinthifolis* e *S. molle* sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa*
96 L. (cebola). Além disso, pretendeu-se investigar a ação citotóxica e genotóxica do extrato aquoso destas
97 duas espécies de *Schinus* sobre células do meristema radicial das espécies-alvo através da determinação
98 dos Índices Mitótico (IM) e Metafásico (IMet) e da avaliação ocorrência de alterações cromossômicas.

99 Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o efeito dos diferentes extratos sobre a integridade de membranas
100 celulares das espécies-alvo.

102 **Material e métodos**

103 Folhas frescas das espécies *Schinus terebinthifolius* e *S. molle* foram coletadas em Porto Alegre
104 (30° 1' 39.73" S 51° 13' 43.45" W), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram comparadas
105 com voucher de *S. molle* (164709) e *S.terebinthifolius* (164707) localizados no Herbário ICN da
106 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As folhas foram pesadas e mantidas em imersão
107 em água destilada na proporção de 1:10. Após 24 horas, o extrato aquoso foi filtrado e 5 mL dos mesmos
108 foram aplicados em placas de Petri de 9 cm. Cinquenta diásporos de *Lactuca sativa* (cv. Grand Rapids) e
109 *Allium cepa* (cv. Baía Periforme) foram distribuídos nas placas, sobre papel filtro. Como controle
110 negativo foi usada água destilada e *N*-(4-hidroxifenil)etanamida (Acetaminofeno, Paracetamol) como
111 controle positivo (Garbulli & Bashasha 2008). Todos os tratamentos (controles e extratos) foram
112 realizados em quatro repetições. Os testes de germinação foram conduzidos em sala de cultivo com
113 temperatura média de 20 °C e fotoperíodo de 12 h. O suprimento de luz foi proporcionado por lâmpadas
114 fluorescentes (20 W), com irradiância média de 7,15 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

115 A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a velocidade de germinação foi realizado através da
116 contagem periódica do número de diásporos germinados, sendo avaliado a cada 12 e 24 h para alface e
117 cebola, respectivamente. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo com
118 método descrito por Borghetti & Ferreira (2004). Após 96 e 168 h (para alface e cebola, respectivamente),
119 avaliou-se a porcentagem final de germinação dos diásporos expostos aos extratos aquosos.

120 Para avaliar o efeito dos extratos aquosos de *Schinus* sobre o crescimento inicial das plântulas, 50
121 diásporos foram previamente germinados em água destilada e posteriormente colocados na presença
122 destes (24 h após a semeadura, para alface e 72 h para cebola). As plântulas em crescimento ficaram em
123 contato com o extrato por um período de 72 h, sendo em seguida realizada a medida do comprimento da
124 raiz primária e do hipocótilo das plântulas obtidas, utilizando papel milimetrado.

125 Para a realização da análise da citotoxicidade, 25 diásporos foram germinados em placas de Petri,
126 de acordo com a metodologia anteriormente citada para o ensaio de germinação. Foram utilizados os
127 mesmos controles citados anteriormente. Os tratamentos foram realizados em quatro repetições. Após 48
128 e 168 h (para alface e cebola, respectivamente) quatro raízes de cada repetição foram seccionadas e
129 fixadas em uma mistura de etanol e ácido acético na proporção de 3:1, permanecendo na temperatura
130 ambiente por um período de 24 h. Após este período, as raízes foram mantidas sob refrigeração (-10 °C)
131 até a realização das análises citogenéticas. As raízes foram lavadas em água destilada por três vezes,
132 submetidas à hidrólise com HCl 5N (temperatura ambiente) por um período de 10 minutos, novamente
133 lavadas, e então submetidas à coloração pelo método de Feulgen por 2 h (Aguiar-Perecin & Vosa, 1985).

134 As lâminas obtidas foram analisadas em fotomicroscópio Zeiss Axioplan®, sendo contadas 8.000 células
135 por tratamento.

136 Os índices mitótico (IM) e metafásico (IMet) foram determinados nos controles e nas raízes
137 tratadas, sendo calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$138 \text{ IM} = \text{número de células em divisão/número total de células meristemáticas} * 100$$

$$139 \text{ IMet} = \text{número de células em metáfase/número total de células meristemáticas} * 100.$$

140 A avaliação genotóxica foi realizada através da observação da ocorrência de alterações
141 cromossômicas mitóticas nos controles e tratamentos. A frequência de alterações foi obtida através da
142 porcentagem de células anormais em relação ao total de células examinadas.

143 A ação dos extratos aquosos de *Schinus* sobre as plântulas-teste também foi avaliada através do
144 vazamento relativo de eletrólitos (REL). Cinquenta diásporos de alface e cebola foram germinados em
145 placas de Petri de acordo com a metodologia citada para avaliação de crescimento inicial. Após oito dias
146 50 mg de raiz e 50 mg de parte aérea de plântulas de alface foram incubados em água destilada (10 mL)
147 na temperatura ambiente por 24 h. No experimento com cebola, foram utilizadas as plântulas inteiras para
148 atingir a massa adequada. A condutividade elétrica da solução foi medida com o auxílio de um
149 condutivímetro. As amostras foram congeladas e descongeladas e a condutividade elétrica foi medida
150 novamente.

151 O vazamento relativo de eletrólitos foi medido de acordo com a seguinte equação:

$$152 \text{ REL (\%)} = \frac{\text{C1}}{\text{C1} + \text{C2}} * 100$$

153
154
155 Onde: C1 = Condutividade medida durante as primeiras 24 h

156 C2 = Condutividade medidos após as 24 h seguintes.

157
158 Comparações entre tratamentos e controle foram obtidas usando *ANOVA* e *post-hoc Student-*
159 *Newman-Keuls (SNK)* para os dados que apresentaram normalidade e homogeneidade de variância. O
160 teste não paramétrico *Kruskal-Wallis'* seguido pelo teste *Tamhene's T2* para comparações múltiplas
161 foram usados quando os dados não seguiam uma distribuição normal. Diferenças foram consideradas
162 significantes com $P=0,05$.

164 **Resultados**

165 O processo de germinação de alface e de cebola não foi afetado significativamente pela exposição
166 aos extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle* em comparação ao grupo controle. Os
167 tratamentos também não induziram uma redução significativa na velocidade de germinação (IVG) das
168 espécies-alvo em relação a ambos os controles (Figura 1A e Fig. 1B). Os extratos aquosos de *S. molle* e *S.*
169 *terebinthifolius* não resultaram em redução significativa do comprimento radicial e do hipocótilo da alface
170 quando comparados ao controle negativo (Figura 2A). Do mesmo modo, as plântulas de cebola expostas

171 aos tratamentos não diferiram significativamente do grupo controle quanto ao crescimento radicial e da
172 parte aérea (Figura 2B). Foi observado o escurecimento das raízes de cebola tratadas com o controle
173 positivo e com o extrato aquoso de *S. terebinthifolius*.

174 Os extratos aquosos estudados apresentaram efeito citotóxico na atividade mitótica somente sobre
175 as raízes de alface (Tabela 1). Comparado ao grupo controle, houve uma redução média no índice
176 mitótico (IM) de 41,22% e 38,32% para o extrato de *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle*,
177 respectivamente. Os diferentes extratos, no entanto, não induziram efeito citotóxico sobre as células
178 meristemáticas radiculares de cebola (Tabela 2). Com relação ao índice metafásico (IMet) não foi
179 detectada redução significativa dos tratamentos quando comparados ao controle negativo para as duas
180 espécies de estudo sobre as diferentes plantas-teste (Tabela 1 e Tabela 2). O número de células de raiz de
181 alface em divisão foi menor nas raízes expostas aos extratos aquosos do que no controle positivo. Tal
182 padrão não foi observado nos experimentos realizados com cebola.

183 Em relação à proporção de células em cada fase mitótica, o efeito inibitório nas espécies-alvo foi
184 observado em células expostas a ambos os tratamentos. A proporção células em anáfase foi reduzida nas
185 células de alface expostas ao aquoso de *S. terebinthifolius* (Tabela 1). O extrato aquoso de *S. molle*
186 também reduziu a proporção de células em anáfase no teste com cebola (Tabela 2).

187 Alterações citogenéticas foram observadas em ambos os tratamentos com *Schinus*, dentre as
188 anomalias destacam-se c-mitoses, fragmentos cromossômicos, pontes e micronúcleos (Figura 3). As
189 espécies-alvo apresentaram diferenças quanto ao tipo de anomalia encontrada. As células de alface
190 mostraram maior frequência de c-mitoses e fragmentos em comparação a outros tipos de alteração
191 (Tabela 3). Enquanto que as células de cebola apresentaram alta frequência de brotos e micronúcleos com
192 relação a outras anomalias (Tabela 4). No entanto, as frequências de tais anormalidades nos dois
193 tratamentos não foram estatisticamente superiores àquelas detectadas nos controles negativos das duas
194 espécies-alvo testadas. Assim, não foi observado efeito genotóxico dos extratos aquosos de *Schinus* sobre
195 as células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* (Tabela 3 e Tabela 4,
196 respectivamente).

197 As diferentes plantas-teste expostas aos extratos aquosos de *Schinus* não apresentaram aumento
198 significativo no vazamento de eletrólitos na solução quando comparadas aos grupos controles. Os extratos
199 de *S. molle* e *S. terebinthifolius* não induziram dano às membranas (Tabela 5).

201 **Discussão**

202 Os aleloquímicos podem agir de maneira diversa dependendo do ambiente e do estágio do ciclo
203 vital em que a planta-alvo se encontra, visto que ambos refletem diferentes estados fisiológicos. Além
204 disso, os efeitos também podem ser variados quando se considera em qual órgão da planta eles estão
205 atuando (Aqüila *et al.* 1999).

206 No presente estudo, a ação do extrato aquoso de folhas frescas de *Schinus terebinthifolius* e *S.*
207 *molle* sobre diásporos de alface e de cebola não demonstrou atividade alelopática em relação aos
208 parâmetros de porcentagem de germinação cumulativa e IVG. Apesar de a germinabilidade ser um índice
209 muito utilizado em estudos alelopáticos, ela envolve apenas aspectos finais da germinação. No entanto, o
210 padrão de germinação pode ser modificado, resultando em alterações na sincronia e velocidade na
211 germinação das plantas-alvo. Estas alterações podem ser devido a diversos efeitos causados em nível
212 primário, como alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no
213 funcionamento de mensageiros secundários, na respiração, devido ao sequestro de oxigênio, na
214 conformação de enzimas e receptores, ou ainda pela combinação destes fatores (Ferreira & Aqüila 2000).

215 Em muitos estudos, o que se observa é um efeito alelopático mais pronunciado sobre o
216 crescimento e desenvolvimento inicial de uma plântula-alvo quando comparado à germinação, já que este
217 último processo utiliza reservas da própria semente (Miró *et al.* 1998, Jacobi & Ferreira 1991, Aqüila
218 2000). Sobre o desenvolvimento inicial, geralmente se constata uma redução no tamanho do eixo
219 hipocótilo-raiz da planta submetida aos compostos alelopáticos (Aqüila & Azambuja 1996, Aqüila *et al.*
220 1999, Rodrigues 2002). Com relação ao crescimento inicial da plântula, neste trabalho não foi observado
221 efeito alelopático dos extratos aquosos das duas espécies de *Schinus* analisadas sobre as espécies alvo.

222 Compostos presentes nos extratos podem ainda modificar a aparência das plântulas. Anomalias
223 morfológicas e perda de vigor das plântulas de alface já foram demonstradas em estudos com extratos de
224 *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aqüila 2000). Miró *et al.* (1998), observou que plântulas de milho
225 tratadas com extratos de frutos de *I. paraguariensis* sofreram redução no tamanho das raízes, e no número
226 de pelos absorventes. Cruz-Ortega *et al.* (1998) relatam que o endurecimento e escurecimento dos ápices
227 radiculares são evidências de alterações morfológicas e ultraestruturais causadas por fitotoxinas. Este
228 último efeito foi observado nas plântulas tratadas com o extrato aquoso de *S. terebinthifolius*, indicando
229 um possível efeito fitotóxico.

230 Estudos anteriores revelaram que o extrato aquoso de *Schinus* possui altas concentrações de
231 compostos fenólicos. Queires & Rodrigues (1998) quantificaram as substâncias fenólicas presente nos
232 órgãos totais de *S. terebinthifolius* com a justificativa de que muitas das atividades desta planta são
233 atribuídas a polifenóis que pertencem a sua constituição estrutural. Os autores observaram uma
234 distribuição irregular dos compostos entre os órgãos da planta, sendo que dentre os órgãos vegetativos da
235 planta, as folhas apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos. A importância dos fenóis na
236 interação de diversas espécies de insetos e plantas tem importantes implicações ecológicas. Um desses
237 exemplos é a atração de polinizadores, induzida pela coloração das flores. As folhas também são ricas em
238 taninos e óleos essenciais constituídos de uma mistura complexa de terpenos (Pawłowski *et al.* 2012), os
239 quais conferem aroma característico às folhas e apresentam conhecida atividade repelente de insetos (Taiz
240 & Zeiger 2006).

241 Os efeitos macroscópicos causados por aleloquímicos são resultado de alterações que ocorrem em
242 nível molecular (Rizvi *et al.* 1992). A limitação do crescimento da planta causada por vários tipos de
243 estresse tem sido fortemente relacionada ao controle da divisão celular. A divisão uniforme de todos os
244 componentes celulares promove o crescimento balanceado do organismo (Reigosa *et al.* 2006). Desta
245 forma, a atividade mitótica (mensurada pelo índice mitótico - IM), a detecção de alterações nas fases
246 mitóticas e a ocorrência de alterações cromossômicas são parâmetros-chave para se avaliar o crescimento
247 regular da planta (Teerarak *et al.* 2010).

248 Os resultados obtidos nas análises citogenéticas indicam que as duas espécies de *Schinus*
249 analisadas apresentam efeito citotóxico que resulta na inibição da atividade mitótica nas células
250 meristemáticas radiculares de alface (Tabela 1). Estes resultados são consistentes com resultados
251 encontrados em outros trabalhos que relacionam inibição de crescimento e redução de IM, observados na
252 avaliação do efeito de óleos essenciais (Pawlowski *et al.* 2012, Silva *et al.* 2011). Extratos aquosos de
253 algumas espécies de plantas apresentaram um efeito oposto ao encontrado no presente estudo. Iganci *et*
254 *al.* (2006), por exemplo, observaram um aumento da atividade mitótica em raízes de *Allium cepa* L.
255 tratadas com extratos aquosos de diferentes espécies de boldo. Neste presente estudo não foi detectado
256 diferença significativa no IM, entre os tratamentos e o controle negativo, nas células meristemáticas
257 radiculares de cebola. Assim, os diferentes extratos aquosos de *Schinus* não induziram efeito citotóxico
258 sobre esta planta-teste.

259 Os extratos aquosos testados também modificaram a proporção de fases mitóticas. A proporção de
260 células em anáfase foi reduzida nas células de alface expostas ao extrato aquoso de *S. terebinthifolius* e
261 nas células de cebola expostas ao extrato de *S. molle*. Sugerindo que os compostos presentes nos extratos
262 estão atuando especialmente sob esta fase. A redução observada na atividade mitótica das células de
263 alface sugere que a exposição aos extratos aquosos de *Schinus* levou a distúrbios no ciclo celular
264 diminuindo o número de células que entram em divisão mitótica. Redução da atividade mitótica pode ser
265 devido à inibição na síntese de DNA na fase S (Sudhakar *et al.* 2001) ou bloqueio da fase G2 do ciclo
266 celular, impedindo a célula de entrar em mitose (Bakke *et al.* 1984). Cinasas cíclicas dependentes (CDKs)
267 e ciclinas relacionadas regulam as transições entre G1-S e G2-fase M, bem como a progressão através do
268 ciclo celular (Zhang *et al.* 2009).

269 As análises citogenéticas indicaram a ocorrência de anormalidades cromossômicas em células
270 expostas aos extratos aquosos de *Schinus*, embora frequências semelhantes tenham sido verificadas
271 também nos controles negativos. As alterações observadas nos tratamentos com *Schinus* podem ser
272 classificadas como clastogênicas, tendo em vista a ocorrência de, principalmente, fragmentos
273 cromossômicos e pontes em anáfase/telófase e micronúcleos, possivelmente resultantes de quebras de
274 DNA, inibição da síntese de DNA ou replicação de DNA alterado (Leme & Marin-Morales, 2009). Os
275 extratos aquosos das duas espécies estudadas induziram a ocorrência de pontes em anáfase e/ou telófase,

276 as quais foram observadas somente nos controles positivo e negativo de alface em menor quantidade. Isto
277 sugere que as alterações decorrentes destes extratos resultam principalmente em eventos clastogênicos.
278 Cromossomos retardatários, c-metáfases, aderências e cromossomos não-orientados na placa equatorial
279 foram também encontrados, sendo estes exemplos de alterações aneugênicas. As anormalidades
280 detectadas condizem com outros estudos que avaliam o potencial alelopático de extratos aquosos e de
281 óleos essenciais (Campos *et al.* 2008, Schmidt-Silva *et al.* 2011). Pawlowski *et al.* (2012) observou uma
282 variedade de efeitos genotóxicos induzidos pelos óleos essenciais de diferentes espécies de *Schinus* no
283 meristema radicial de alface e de cebola. Neste trabalho, no entanto, este parâmetro não apresentou um
284 aumento estatisticamente significativo em nenhum dos tratamentos.

285 As plântulas de alface e de cebola tratadas com os extratos aquosos de *S. molle* e *S.*
286 *terebinthifolius* não apresentaram alteração na integridade de suas membranas celulares quando
287 comparadas ao grupo controle. A avaliação da integridade de membranas é realizada através da medida
288 do REL em um tecido não danificado e após uma lesão forçada, gerada pelo congelamento. Uma
289 diferença baixa entre o vazamento primário e o secundário reflete que houve danos anteriores à lesão,
290 possivelmente decorridos da exposição a uma substância nociva para a planta. O nível de dano sobre a
291 integridade de membrana geralmente é dependente do tempo de exposição e da dosagem. Schmidt-Silva
292 *et al.* (2012) observou um aumento no níveis de REL expostas a dosagens mais altas de óleos essenciais
293 de espécies de *Heterothalamus* Less.

294 Os extratos aquosos de *S. molle* e *S. terebinthifolius* causaram efeito tóxico somente sobre as
295 células meristemáticas de *Lactuca sativa* através da redução do IM, entre todos os parâmetros analisados
296 sobre as duas plantas-teste, não sendo observada atividade potencialmente alelopática. Este estudo
297 demonstra que as substâncias hidrossolúveis, compostas majoritariamente por derivados fenólicos não
298 possuem atividade nociva acentuada como nos óleos essenciais, ricos em terpenoides. Estudos anteriores
299 demonstraram a atividade fitotóxica, citotóxica e genotóxica dos voláteis de *Schinus* (Pawlowski *et al.*
300 2012). No entanto, o uso destas espécies como medicinal, geralmente consumido na forma de extrato
301 aquoso, ainda precisa ser investigado utilizando outros modelos.

303 **Agradecimentos**

304 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela Bolsa PIBIC concedida ao
305 primeiro autor, ao Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade
306 Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de
307 Botânica da UFRGS, pela infra-estrutura cedida.

Referências bibliográficas

311
312 Aguiar-Perecin, M. L. R. de & Vosa, C. 1985. C-banding in maize. II. Identification of somatic
313 chromosomes. **Heredity** 54: 37-42.

314
315 AÇÜILA, M.E.A.; AZAMBUJA, F.J. 1996. Allelopathy in a Natural Brazilian Woodland, Evaluation of
316 the *Crysophilum gonocarpum* (Aguai). In: **WORLD CONGRESS ON ALLELOPATHY, A**
317 **SCIENCE FOR THE FUTURE, Cadiz. Book of Abstracts.** Cadiz: Int. Allelop. Soc. p. 57.

318
319 AÇÜILA, M.E.A.; SILVA, L.P.; LAUFER, M.P. 1999. Screening bioassay to detect allelopathy in a
320 natural Brazilian woodland: evaluation of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). In: **WORLD CONGRESS ON**
321 **ALLELOPATHY, CRITICAL ANALYSIS & FUTURE PROSPECTS. 2. Book of Abstracts.**
322 Thunder Bay: Int. Allelop. Soc. p. 52.

323
324 AÇÜILA, M.E.A.; UNGARETTI, J.A.C.; MICHELIN, A. 1999. Preliminary observation on allelopathic
325 activity in *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. **Acta Horticultura** 502: 383-388.

326
327 AÇÜILA, M.E.A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e
328 crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia, Série Botânica** 53: 51-66.

329
330 BAKKE, O; JAKOBSED, K; EIK-NES, K.B. 1984. Concentration-dependent effects of potassium
331 dichromate on the cell cycle. **Cytometry** 5: 482-486.

332
333 BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. 2004. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA,
334 A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 209-222.

335
336 CAMPOS, J.M.S; DAVIDE, L.C; SOARES,G.L.G; VICCINI,L.F. 2008. Mitodepressive and clastogenic
337 effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales,
338 Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology** 31(1): 141-145.

339
340 CERUKS, M; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A; LAGO, J.H.G. 2007. Constituintes fenólicos polares de
341 *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE) **Química Nova** 30(3): 597-599.

342
343 CRUZ-ORTEGA, R. et al. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyios deppei* on seedling
344 root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* e *Curcubita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology.** New York
345 24(12): 2039-2057.

346

347 DAMASCENO, F.C.; NICOLLI, K.P.; CARAMÃO, E.D.; SOARES, G.L.G.; ZINI, C.A. 2010. Changes
348 in the Volatile Organic Profile of *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) and *Baccharis spicata* (Asteraceae)
349 Induced by Galling Psyllids. **Journal of Brazilian Chemical Society** 21(3): 556-563.

350

351 ERAZO, S.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; GARCÍA, R.; ZALDÍVAR, M.; FERREIRA, A.G. &
352 AQUILA, M.E.A. 2000. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de**
353 **Fisiologia Vegetal** 12: 175-204. Suplemento.

354

355 FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista**
356 **Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12(Edição especial): 175-204.

357

358 GARBULLI, F.R.E.; BASHASHA, J.A. 2008. Hazard of paracetamol addiction on cell division.
359 Garyounis University Press. **Journal of Science and Its Applications**: 2(1): 6-11.

360

361 HARBORNE, J.B. 1993. **Introduction to ecological biochemistry**. 4 ed. Academic Press, London.

362

363 IGANCI, J., BOBROWSKI, V., HEIDEN, G., STEIN, V., ROCHA, B. 2006. Efeito do extrato aquoso de
364 diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do**
365 **Instituto Biológico** 73: 79–82.

366

367 JACOBI, U.S.; FERREIRA, A.G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre
368 espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 26(7): 935-943.

369

370 LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review
371 on its application. **Mutation Research**. São Paulo, Brasil, 682(1): 71-81.

372

373 MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex*
374 *paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33(8): 1261-1270.

375

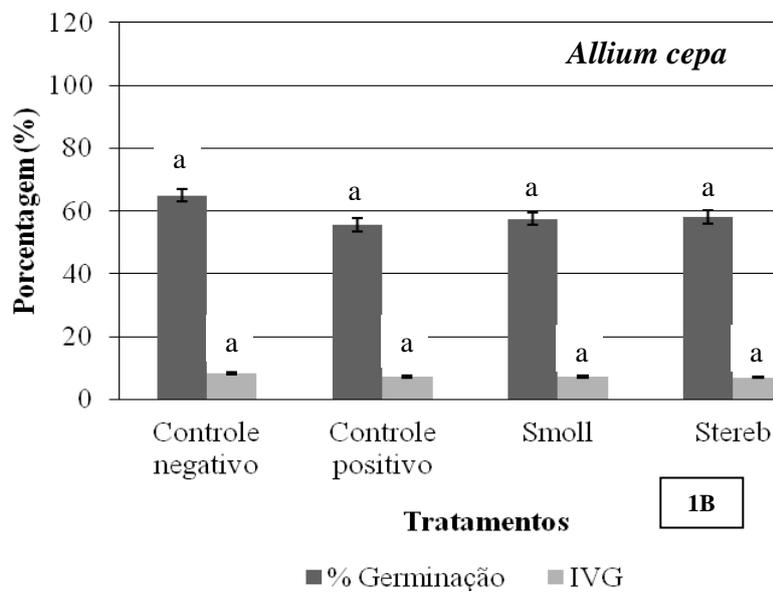
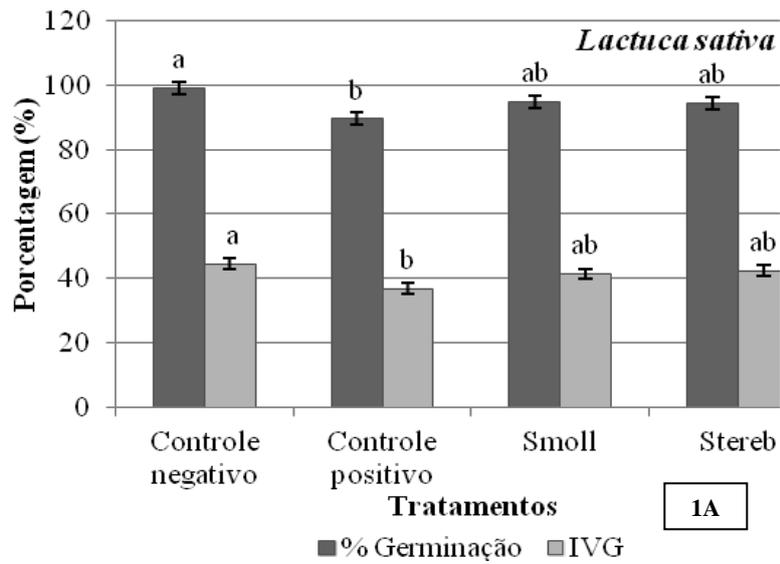
376 MORGAN, E.C.; OVERHOLT, W.A. 2005. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus*
377 *terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae) aqueous extract on germination and growth of selected Florida
378 native plants. **Journal of the Torrey Botanical Society** 132(1): 11-15.

379

380 PAWLOWSKI, A.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E. B.; SOARES, G.L.G. 2012.
381 Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic
382 inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany** 80: 96-103.
383
384 PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C.
385 2001. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da
386 peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13(1): 55-65.
387
388 QUEIRES, L.C.S; RODRIGUES, L.E.A. 1998.Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos
389 da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Brazilian Archives Biology Technology** 41(2): 247-53.
390
391 REIGOSA, MJ.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; DE LA PEÑA, T.C.;
392 REIGOSA, R.M.J. 2006. Cell cycle analyses for understanding growth inhibition. In 'Allelopathy'. (Eds
393 MJ Reigosa, N Pedrol) 141–156. (Springer: The Netherlands)
394
395 RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K. & RIZVI, V. 1992. A discipline called allelopathy. 1-10. In:
396 S.J.H. Rizvi & V. Rizvi (eds.). **Allelopathy: basic and applied aspects** London, Chapman & Hall.
397
398 RODRIGUES, K. C. S.; AQUILA, M. E. A. 2002. *Verificação da atividade alelopática de Myrciaria*
399 *cuspidata* Berg. (Camboim). 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências,
400 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
401
402 SANTOS, A.C.A. DOS; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI,
403 V.C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. 2010. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and
404 *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de**
405 **Farmacognosia** 20(2): 154-159.
406
407 SCHMIDT-SILVA, V.; PAWLOWSKI, A.; SANTOS, E.K.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G. 2011.
408 Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of**
409 **Botany** 59: 681–690.
410
411 SCHMIDT-SILVA, V.; PAWLOWSKI, A.; ISAIAS, R.M.S.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G. 2012.
412 Phytotoxicity of the essential oils from two species of *Heterothalamus* lessing (asteraceae) on early
413 development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and onion (*Allium cepa* L.). Dados não publicados.
414

- 415 SUDHAKAR, R.; GOWDA, N.; VENU, G. 2001. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry
416 effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia** 66: 235-239.
- 417
- 418 TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2006. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Artmed, 3^a ed, Porto Alegre, 309-332.
- 419
- 420 TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. 2010. Evaluation of allelopathic,
421 decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on
422 bioassay plants. **Bioresource Technology** 101(14): 5677-5684.
- 423
- 424 ZHANG, Y; GU, M; XIA, X; SHI, K; ZHOU, Y; YU, J. 2009. Effects of phenylcarboxylic acids on
425 mitosis, endoreduplication and expression of cell cycle-related genes in roots of cucumber (*Cucumis*
426 *sativus* L.). **Journal of Chemical Ecology** 35: 679-688.

1 **Anexos**



32 **Figura 1.** Porcentagem de germinação cumulativa e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes expostas aos
33 extratos aquosos de *Schinus molle* (Smoll) e *Schinus terebinthifolius* (Stereb), controle negativo e controle positivo. A-
34 *Lactuca sativa.*; B- *Allium cepa.* Letras diferentes indicam diferença significativa (*Tamhane's T2* ou *Tukey*, $p < 0,05$) entre as
35 médias.

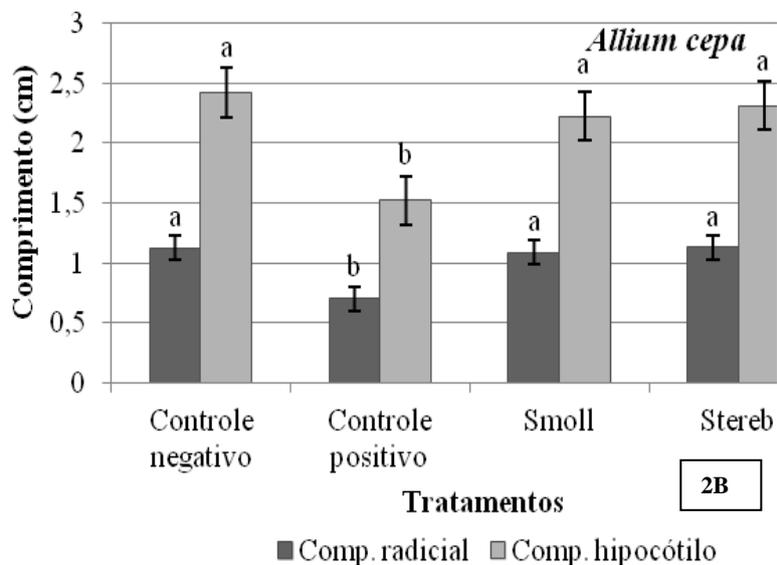
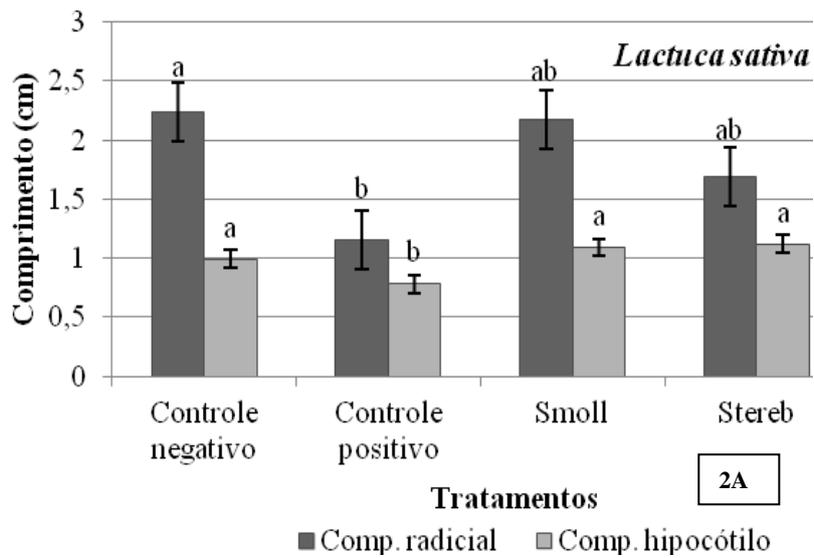


Figura 2A. Efeito fitotóxico dos extratos aquosos de *Schinus molle* (Smoll) e *Schinus terebinthifolius* (Stereb) sobre o comprimento radicial (Comp. radicial) e comprimento do hipocótilo (Comp. Hipocótilo) das plântulas-teste estudadas. A- *Lactuca sativa*.; B- *Allium cepa* . Letras diferentes indicam diferença significativa (Tamhane's T2 ou Tukey, $p < 0,05$) entre as médias.

85 **Tabela 1.** Índice mitótico, índice metafásico e proporção de fases mitóticas de células do meristema radicular de alface
 86 expostas aos extratos aquosos de *Schinus*.

Tratamento	Células em divisão	Índice	Índice	Fases mitóticas			
		mitótico (média ± DP)	metafásico (média ± DP)	% Prófase	% Metáfase	% Anáfase	% Telófase
Controle negativo	1407	17,59 ± 2,83 ^a	3,46 ± 0,8 ^a	57,90 ± 3,82 ^a	19,73 ± 3,92 ^a	9,76 ± 1,85 ^a	12,60 ± 2,13 ^a
Controle positivo	1367	17,09 ± 3,28 ^a	3,93 ± 1,04 ^a	59,47 ± 3,63 ^a	22,81 ± 2,57 ^a	7,98 ± 1,17 ^{ab}	9,74 ± 1,88 ^a
<i>Schinus terebinthifolius</i>	827	10,34 ± 1,42 ^b	2,36 ± 0,63 ^a	59,94 ± 4,62 ^a	22,65 ± 3,56 ^a	6,33 ± 1,96 ^b	11,09 ± 3,58 ^a
<i>Schinus molle</i>	868	10,85 ± 0,67 ^b	2,74 ± 0,63 ^a	54,89 ± 7,16 ^a	25,09 ± 4,83 ^a	8,89 ± 0,81 ^{ab}	11,13 ± 3,07 ^a

87
 88 Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna, não diferem entre si de acordo com T2 Tamhane ou SNK, a 5% de probabilidade de erro.
 89
 90

91 **Tabela 2.** Índice mitótico, índice metafásico e proporção de fases mitóticas de células do meristema radicular de cebola
 92 expostas aos extratos aquosos de *Schinus*.

Tratamento	Células em divisão	Índice	Índice	Fases mitóticas			
		mitótico (média ± DP)	metafásico (média ± DP)	% Prófase	% Metáfase	% Anáfase	% Telófase
Controle negativo	694	8,68 ± 1,48 ^a	2,05 ± 0,46 ^a	43,44 ± 9,58 ^b	23,75 ± 3,93 ^a	16,46 ± 3,35 ^a	16,36 ± 5,26 ^{ab}
Controle positivo	1002	12,53 ± 5,29 ^a	2,35 ± 1,23 ^a	61,44 ± 7,81 ^a	18,10 ± 3,34 ^a	8,35 ± 1,31 ^b	12,11 ± 6,15 ^b
<i>Schinus terebinthifolius</i>	744	9,30 ± 1,18 ^a	2,26 ± 0,45 ^a	42,23 ± 2,96 ^b	24,18 ± 2,26 ^a	12,70 ± 3,55 ^{ab}	20,89 ± 4,70 ^{ab}
<i>Schinus molle</i>	870	10,88 ± 1,52 ^a	2,15 ± 0,15 ^a	45,78 ± 4,93 ^b	20,07 ± 3,03 ^a	10,68 ± 1,28 ^b	23,47 ± 4,05 ^a

93
 94 Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna, não diferem entre si de acordo com T2 Tamhane ou SNK, a 5% de probabilidade de erro.
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113

114 **Tabela 3.** Porcentagem de anormalidades cromossômicas observadas em células do meristema radicular de alface e
 115 porcentagem de cada anormalidade dentre as células expostas aos extratos aquosos de *Schinus*.

	Controle negativo	Controle positivo	<i>Schinus terebinthifolius</i>	<i>Schinus molle</i>
% Anormalidades (média ± DP)	0,08 ± 0,12^a	0,46 ± 0,13^b	0,09 ± 0,06^a	0,09 ± 0,08^a
Broto em interfase	0	0	0	0
Micronúcleo em interfase	0	0	0	0
Micronúcleo em prófase	0	2,7	0	0
C-mitose	66,7	67,6	42,9	71,4
Aderência	0	0	0	0
Micronúcleo em metáfase	0	0	0	0
Fragmento em metáfase	0	13,5	14,3	14,3
Cromossomo desorientado em metáfase	0	5,4	0	0
Fragmento em anáfase	0	2,7	14,3	0
Cromossomo retardatário em anáfase	0	2,7	0	0
Ponte anafásica	16,7	2,7	28,6	0
Micronúcleo em telófase	0	0	0	0
Fragmento em telófase	0	0	0	0
Cromossomo retardatário em telófase	0	2,7	0	0
Ponte telofásica	0	0	0	14,3

116
 117 Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna, não diferem entre si de acordo com *T2 Tamhane* ou *SNK*, a 5% de probabilidade de erro.

118

119

120 **Tabela 4.** Porcentagem de anormalidades cromossômicas observadas em células do meristema radicular de cebola e
 121 porcentagem de cada anormalidade dentre as células alteradas expostas aos extratos aquosos de *Schinus*.

	Controle negativo	Controle positivo	<i>Schinus terebinthifolius</i>	<i>Schinus molle</i>
% Anormalidades (média ± DP)	0,14 ± 0,08^a	5,14 ± 0,44^b	0,51 ± 0,21^a	0,64 ± 0,36^a
Broto em interfase	0,0	3,9	7,8	4,9
Micronúcleo em interfase	50,0	77,4	54,9	41,5
Micronúcleo em prófase	0,0	0,5	2,0	0,0
C-mitose	8,3	5,1	2,0	7,3
Aderência	0,0	0,0	7,8	0,0
Micronúcleo em metáfase	8,3	0,0	0,0	0,0
Fragmento em metáfase	8,3	1,7	0,0	0,0
Cromossomo desorientado em metáfase	8,3	0,7	7,8	12,2
Fragmento em anáfase	8,3	3,2	0,0	0,0
Cromossomo retardatário em anáfase	8,3	1,2	0,0	0,0
Ponte anafásica	0,0	0,0	9,8	29,3
Micronúcleo em telófase	0,0	1,0	0,0	2,4
Fragmento em telófase	0,0	4,4	2,0	0,0
Cromossomo retardatário em telófase	0,0	1,0	0,0	0,0
Ponte telofásica	0,0	0,0	5,9	2,4

122
 123 Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna, não diferem entre si de acordo com *T2 Tamhane* ou *SNK*, a 5% de probabilidade de erro.

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

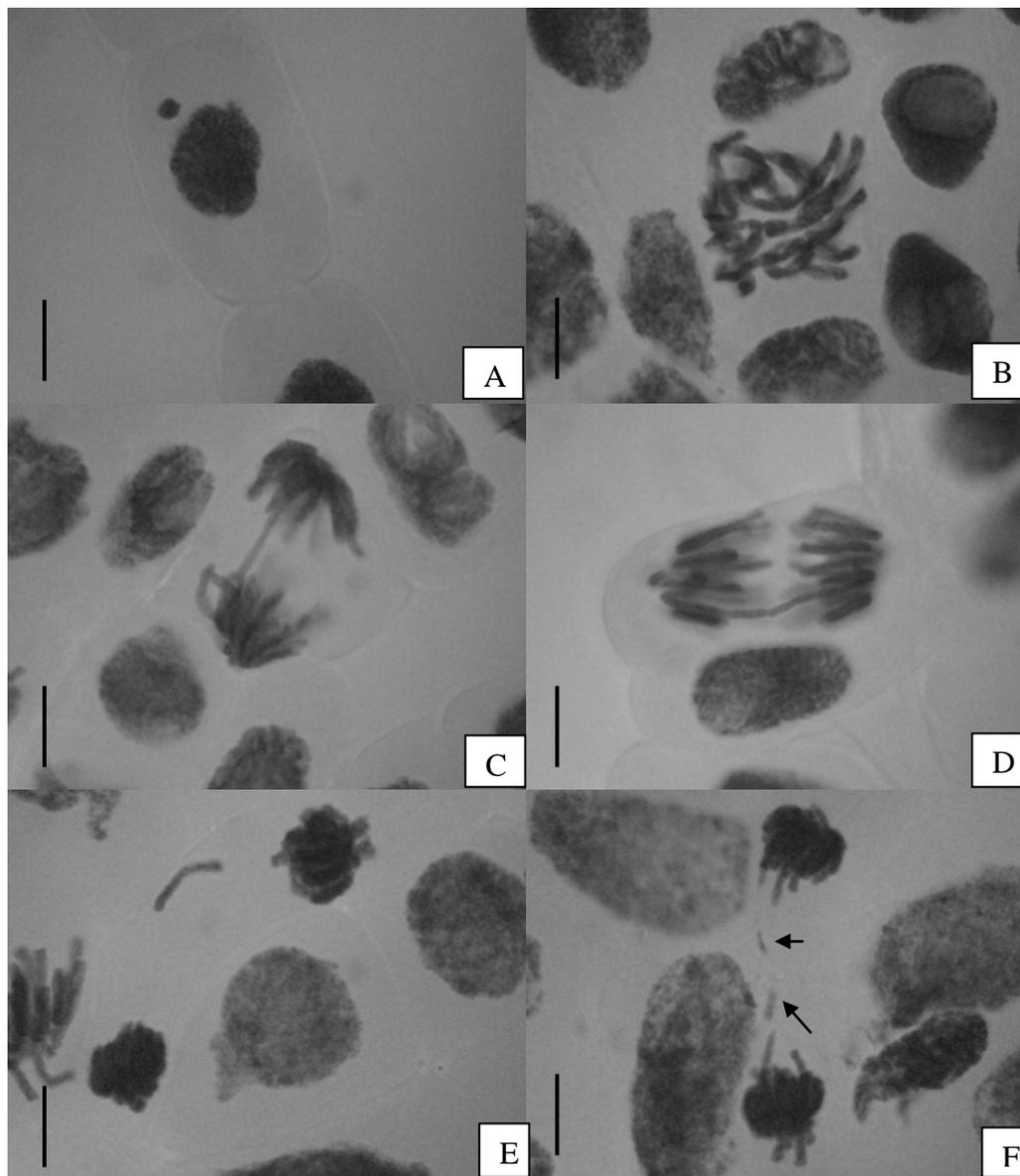


Figura 3. Anormalidades cromossômicas observadas em células de *Allium cepa*. A- Micronúcleo. B- C-mitose. C e D- Ponte anafásica. E- Cromossomo retardatário em telófase. F- Fragmentos em telófase (setas). Barra representa 10 μ m.

Tabela 5. Vazamento relativo de eletrólitos (REL) sobre raiz e parte aérea de alface e sobre plântulas de cebola expostas aos extratos aquosos de diferentes espécies de *Schinus*.

	REL Alface		REL Cebola
	Raiz (média \pm DP)	Parte Aérea (média \pm DP)	(média \pm DP)
Controle negativo	35,43 \pm 4,61 ^a	9,75 \pm 1,26 ^a	4,00 \pm 0,74 ^a
Controle positivo	36,72 \pm 2,03 ^a	11,00 \pm 1,30 ^a	12,5 \pm 5,33 ^a
<i>Schinus terebinthifolius</i>	37,78 \pm 1,82 ^a	8,75 \pm 2,40 ^a	7,25 \pm 3,00 ^a
<i>Schinus molle</i>	32,25 \pm 2,32 ^a	4,50 \pm 1,14 ^a	8,33 \pm 14,52 ^a

Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna, não diferem entre si de acordo com T2 Tamhane ou SNK, a 5% de probabilidade de erro.