

MAIARA DOS SANTOS RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE
EXTRATOS VEGETAIS

Altamira-Pará
2019

MAIARA DOS SANTOS RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE
EXTRATOS VEGETAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Campus de Altamira, como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Magali Gonçalves Garcia

Altamira-Pará
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

R696a Rodrigues, Maiara dos Santos
Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de extratos
vegetais / Maiara dos Santos Rodrigues. — 2019.
46 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Magali Gonçalves Garcia
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - , , Universidade
Federal do Pará, Altamira, 2019.

1. Alterações cromossômicas . 2. Índices mitóticos. 3. Teste
Allium cepa. I. Título.


CDD 571.6

MAIARA DOS SANTOS RODRIGUES


AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE
EXTRATOS VEGETAIS


Trabalho de conclusão de curso submetido à aprovação
como requisito parcial para obtenção de grau de licenciado
em Ciências Biológicas, pela banca examinadora formada
pelos professores:

Orientadora:


Prof. Dr. Magali Gonçalves Garcia
Faculdade de Ciências Biológicas-UFPA/Altamira

Banca examinadora:


Prof. Dr. Tatiana da Silva Pereira
Faculdade de Ciências Biológicas-UFPA/Altamira


Mestranda Brenda Tayná Sousa da Silva
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

Altamira-Pará, 20 de Dezembro de 2019

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

A minha família e aos que de certa forma se tornaram parte dela.

Aos que estavam todos os dias comigo e aos que estavam todo o tempo em meus pensamentos.

Aos que estavam no meu fracasso e aos que estão no meu sucesso,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará e a Faculdade de Ciências Biológicas, seu corpo docente e administrativo por terem tornado possível a minha formação e por oportunizarem experiências e aprendizagens durante toda a graduação.

A minha orientadora, Magali, por ter me orientado com paciência e dedicação e me proporcionado momentos de muita aprendizagem, alegria e descontração, tornando as coisas mais leves com o seu jeitinho meio meigo, porém bruto.

Aos meus pais Maria Clenis e José Carlos por sempre me apoiarem nos estudos e nas buscas pelos meus sonhos, por serem os melhores exemplos que eu poderia ter na vida em relação a vários aspectos e as minhas irmãs Maysa e Maianny por me ajudarem em diversos momentos.

A Tuma Bio 2016 pela troca de conhecimentos durante esses quatro anos, pelos diversos momentos de festas, alegria, comemoração, principalmente nas aulas de campo, e até mesmo pelos momentos de brigas, que não foram poucos... Olhando agora eu acho até graça, pois até com isso aprendemos algo.

A minha colega de laboratório, Brenda Tayná, por ter me ajudado em diversos momentos, principalmente na estatística, por ter repassado alguns conhecimentos, por me proporcionar momentos divertidos de distração, alegria e muitas risadas no laboratório.

As minhas amigas Leticia e Deuvanete pela amizade durante todos esses anos, por sempre me ajudarem quando eu precisava, por sempre estarem do meu lado mesmo nos meus momentos de estresse, por tornarem a graduação mais alegre e cheia de momentos felizes e ao Francinei pela parceria, por sempre me apoiar e me incentivar, ajudar nos momentos difíceis e assim tornando os meus problemas bem mais fáceis de serem enfrentados, sem dúvidas vocês três são um dos maiores presentes que a graduação me deu e quero levar para toda a vida, nem que sejam apenas memórias.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo, Obrigada!

RESUMO

Os metabólitos secundários são substâncias químicas produzidas pelas plantas vasculares que podem ser utilizados na medicina científica e popular sob a forma de extratos e infusões vegetais, ou que podem ainda ser úteis para a produção agrícola, como fertilizantes ou herbicidas naturais, menos prejudiciais ao ambiente e animais. Entretanto, para todas essas aplicações faz-se necessário identificar e quantificar os possíveis riscos toxicológicos associados à sua utilização. O objetivo desse trabalho foi analisar o potencial citotóxico e genotóxico de extratos aquosos de três espécies com ocorrência na Amazônia que possuem importância medicinal e regional. As espécies selecionadas foram a *Mimosa setosa* Benth Var. *paludosa* Benth Barn (Fabaceae), *Tilesia baccata* (L.f) Prusk (Asteraceae) e *Theobroma speciosum* Willd ex. Spreng (Malvaceae). Para analisar o potencial de citotoxicidade e genotoxicidade dessas espécies foram preparados extratos aquosos nas concentrações de 20mg/mL, 60mg/mL e 100mg/mL, os quais foram submetidos à avaliação através do sistema teste *Allium cepa*, e comparados ao controle (água destilada). Para o teste de citotoxicidade foi avaliado o índice mitótico (IM) e para o teste de genotoxicidade (IG) foi avaliado o índice de alterações cromossômicas. Os resultados obtidos nos testes foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que as concentrações de 60 e 100 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa* apresentaram inibição significativa do índice mitótico em relação ao controle, apresentando atividades citotóxicas e genotóxicas por inibirem a divisão celular a partir da prófase e possivelmente, induzirem apoptose celular. Na concentração de 20 mg/mL houve alteração cromossômica significativa em relação ao controle, além de induzir possível apoptose, apresentando, dessa forma, atividade genotóxica. As concentrações de 20 e 100mg/mL do extrato aquoso de *T. baccata* apresentaram inibições significativas no índice mitótico em relação ao controle, sendo consideradas citotóxicas, nos resultados de genotoxicidade nenhuma concentração teve diferença estatística comparado ao controle. As concentrações de 60 e 100 mg/mL do extrato aquoso de *T. speciosum* apresentam inibição significativa do índice mitótico em relação ao controle, apresentando potencial citotóxico, mas nenhum efeito genotóxico significativo.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas, Índice mitótico, Teste *Allium cepa*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Sistema teste <i>Allium cepa</i>	16
Figura 2: <i>Mimosa setosa</i> benth var. <i>paludosa</i> benth barn(Fabaceae).....	17
Figura 3: <i>Tilesia baccata</i> (L.f.) Pruski (Asteraceae).....	18
Figura 4: <i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng (Malvaceae).....	19
Figura 5: Esquema de um bioensaio. (Bulbos de cebolas em contato com extrato e suas respectivas concentrações).....	23
Figura 6: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas aos tratamentos controle e/ou 20 mg/mL do extrato aquoso das folhas de <i>M. setosa</i> . a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.Telófase.....	26
Figura 7: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas à concentração 60 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> .a.Prófase.....	26
Figura 8: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas à concentração 100 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> .a.Prófase.....	26
Figura 9: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> com alterações cromossômicas submetidas à concentração de 20 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> . a.Prófase irregular. b.Metáfase irregular. c.Metáfase com aderência cromossômica. d.Metáfase com perca de cromossomo. e.Metáfase com cromossomo em anel. f.Anáfase irregular. g.Ponte anafásica. h.Anáfase com perca de cromossomo. i.Telófase irregular.....	28
Figura 10: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas à concentração 60 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> . As setas a.; b. e c. indicam células em apoptose.....	30
Figura 11: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas à concentração 100 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> . As setas a.; b.; c.; d.; e. e f. indicam células em apoptose.....	30
Figura 12: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas à concentração 20 mg/mL do extrato aquoso de <i>M. setosa</i> . a.Célula em apoptose.....	30
Figura 13: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas ao extrato aquoso das folhas de <i>T. baccata</i> em diferentes fases da mitose. a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.telófase.....	32
Figura 14: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> com alterações cromossômicas submetidas ao extrato aquoso de <i>T. baccata</i> . a.Metáfase irregular. b.Metáfase com aderência cromossômica. c.Ponte Anafásica. d.Telófase irregular.....	33
Figura 15: Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> em divisão celular, submetidas ao extrato aquoso das folhas de <i>T. speciosum</i> . a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.Telófase.....	35

Figura 16: Células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas submetidas ao extrato aquoso das folhas de *T. speciosum*. a.Prófase irregular. b.Metáfase irregular. c.Metáfase com aderência cromossômicas. d.Metáfase com aderência cromossômicas. e.Ponte anafásica. f.Telófase irregular. g.Anáfase irregular. h.Anáfase com perda cromossômica.....37

Tabela 1: Número de células em fases da mitose submetidas ao extrato aquoso de *M. setosa* e o índice mitótico (IM) de cada tratamento. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....25

Tabela 2: Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos tratamentos do extrato aquoso de *M. setosa*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....27

Tabela 3: Número de células em fases da mitose e o índice mitótico (IM) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. baccata*. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....32

Tabela 4: Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. baccata*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....34

Tabela 5: Número de células em fases da mitose e o índice mitótico (IM) submetidas ao extrato aquoso de *T. speciosum*. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....35

Tabela 6: Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. speciosum*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	12
1.1.1 Aplicação dos metabólitos secundários	13
1.2 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	15
1.2.1 Sistema teste <i>Allium cepa</i> L	16
1.3 ESPÉCIES SELECIONADAS	17
1.3.1 <i>Mimosa setosa</i> Benth var. <i>paludosa</i> Benth Barn (Fabaceae)	17
1.3.2 <i>Tilesia baccata</i> (L.F) Pruski (Asteraceae)	18
1.3.3 <i>Theobroma speciosum</i> Willd ex. Spreng (Malvaceae)	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 COLETA DO MATERIAL	22
3.2 PREPAROS DOS EXTRATOS	22
3.3 BIOENSAIOS	22
3.4 ANÁLISES DOS DADOS	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 <i>MIMOSA SETOSA</i> BENTH VAR.PALUDOSA BENTH BARN	25
4.2 <i>TILEZIA BACCATA</i> (L.F) PRUSKI	32
4.3 <i>THEOBROMA SPECIOSUM</i> WILLD EX SPRENG.....	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas vasculares possuem uma grande variedade de compostos químicos, que são produtos do seu metabolismo secundário denominados de “fitoquímicos” ou “metabólitos secundários” que diferem em sua composição de acordo com a família e a espécie na qual está produzindo-o. Esses compostos químicos atuam com uma contribuição importante para os odores, sabores, cores específicas de plantas (BENNETT & WALLSGROVE, 1994).

Os Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenóides, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio que são os alcaloides (CROTEAU & KUTCHAN & LEWIS 2000).

Terpenoides são as classes de produtos vegetais naturais que mais variam estruturalmente. Os monoterpenos, por exemplo, devido ao seu baixo peso molecular, costumam serem substâncias voláteis, assim denominados de óleos essenciais ou essências, utilizados industrialmente para sabores e perfumes. Nas plantas os óleos essenciais possuem a função tanto para atrair polinizadores quanto para repelir insetos (VIZZOTO & KROLOW & WEBER, 2010; KABERA et al., 2014; DELGOLA & MURRAY, 2017).

Os fenólicos formam um grupo de compostos bastante presente no nosso dia a dia. Muitos dos componentes deste grupo são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais, não sendo apenas atrativos para o homem, mas também para outros animais, pois são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Os alcaloides são uma classe de compostos do metabolismo secundário famoso pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo várias delas utilizadas como venenos ou alucinógenos (VIZZOTO & KROLOW & WEBER, 2010; KABERA et al., 2014; DELGODA & MURRAY, 2017).

Os metabólitos secundários também são componentes de enorme importância na defesa ativa protegendo as plantas de predadores de uma maneira geral e na competição com outros vegetais, pois podem ter ações inibitórias ou estimulantes no crescimento e/ou desenvolvimento de outros indivíduos (AKULA & RAMAKRISHNA, 2011). Essa atividade realizada pelas plantas é denominada de “potencial alelopático” (RIZVI et al., 1992).

1.1.1 Aplicação dos metabólitos secundários

O uso dos metabólitos secundários para outros fins deu início pelo o homem primitivo que sempre procurou encontrar recursos que facilitassem o desenvolvimento das suas necessidades básicas de sobrevivência, alimentação, moradia, proteção e reprodução. Ao longo das suas observações e experiências fizeram descobertas importantes através do uso das plantas e ervas, utilizando-as no tratamento de doenças (VIEGAS JR & BOLZANI & BARREIRO, 2006; SHAKYA, 2016).

Extratos e infusões de plantas e ervas continuam sendo muito utilizados, principalmente por populações tradicionais para fins medicinais e essa utilização contribui de modo significativo para a medicina, pois fornecem conhecimentos sobre possíveis propriedades de uma grande variedade de plantas (SIMÕES et al.,1998). No entanto, muitas vezes essas utilizações são feitas sem a realização de análises científicas que comprovem a eficácia dessas substâncias e em uma mesma fração de extrato podem realmente ser encontrados substâncias benéficas, mas também compostos de natureza tóxica (PETEROS & UY, 2010; SANTOS et al., 2019).

A utilização de extratos, infusões e chás de plantas sem devidos estudos, podem acarretar em diversos problemas para quem consome, pois ao longo dos anos foi descoberto que específicas plantas produzem substâncias perigosas, com compostos químicos potencialmente agressivos que podem ocasionar diferentes complicações para quem o consome, por este motivo,

devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (BELCAVELLO et al., 2012; EKOR, 2014).

Além da utilização de extratos vegetais para fins medicinais, as biomoléculas ativas contidas em extratos e que são capazes de inibir a germinação e/ou crescimento de outros organismos, podem ser usados na agricultura, devido atualmente ela ter como um dos seus principais problemas o controle de pragas e doenças (PANNACCI & TEI, 2014).

Antes das facilidades na obtenção de agrotóxicos para solucionar esses problemas, os agricultores utilizavam de produtos naturais, muito desses produtos eram extratos vegetais que agora estão sendo vistos como produtos alternativos. Devido aos conhecimentos obtidos sobre os efeitos que agrotóxicos ocasionam na saúde humana e no ambiente, e essas descobertas está estimulando a produção diferentes técnicas para substituir herbicidas e inseticidas sintéticos por produtos naturais, por serem menos prejudiciais aos animais (TAVARES et al., 2009; PANNACCI & TEI, 2014).

A utilização de herbicidas naturais é um método que além de ser menos prejudicial, diminui custos, preserva o ambiente e os alimentos que consumimos de serem contaminados, tornando essa utilização pertinente para agricultura sustentável, e a diversidade de espécies de plantas existentes no Brasil demonstra um alto potencial para as pesquisas e estudos sobre esses compostos secundários que apresentam essas atividades (DE SOUZA; JUNIOR, 2009).

Devido a isso, é necessário um maior número de pesquisas sobre as substâncias biologicamente ativas contidas nessas plantas comumente utilizadas por populações tradicionais, sem embasamento científico nenhum, para que se possam determinar seus efeitos com mais exatidão e quantificar as doses máximas e mínimas que podem ser ingeridas, a fim de oferecer eficácia sem riscos de toxicidade e servir como base para a busca de novos medicamentos, inseticidas e herbicidas naturais (HUSSAIN et al., 2012).

1.2 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Diversas pesquisas são realizadas sobre a atividade alelopática de plantas, porém se referem apenas ao efeito que esses fitoquímicos causam sobre a germinação e crescimento de plantas teste utilizadas, mas também é de suma importante avaliar a ação de tais compostos químicos a nível celular, para conhecer quais são os seus mecanismos de ações (SOUZA FILHO & ALVES, 2000).

Os fitoquímicos podem causar danos ou alterações na divisão celular dos organismos submetidos a eles, quando ocasiona aumento redução de 50% do índice mitótico este efeito é denominado de citotoxicidade (FISKESJÖ, 1985; CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2005) quando ocasiona mudanças na estrutura físico-química e alteração no DNA nuclear, esta atividade é denominada de genotoxicidade (FRANCHI, 2012).

Quando um extrato vegetal possui efeito genotóxico, pode ocasionar danos no fuso mitótico de células e isso resulta em diversas alterações cromossômicas. Essas anomalias nos cromossomos podem ser de diferentes maneiras, tais como, aderências cromossômicas, pontes anafásicas, perdas de cromossomos e etc. As pontes anafásicas são ocasionadas pelas quebras cromossômicas, as perdas de cromossomos e aderências cromossômicas aumentam o risco de aneuploidia nas células (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Para avaliar a presença do potencial de citotoxicidade e genotoxicidade de uma substância é necessária à utilização de indicadores sensíveis que permitam detectar a ação de compostos químicos, essa utilização pode ser através de plantas que são consideradas ideais para esses estudos por serem bioindicadoras (GUIMARÃES et al., 2000; PARMAR & RAWTANI & AGRAWAL, 2016).

1.2.1 Teste *Allium cepa* L.

Foram desenvolvidos diversos ensaios que possibilitam as análises de citotoxicidade e genotoxicidade, uma delas é o teste vegetal *Allium cepa* L. (**Figura 1**) que é muito utilizado por ser vantajoso devido à espécie possuir grandes cromossomos, serem fáceis de observar com um microscópio de luz, podendo revelar um efeito mesmo sendo submetidas a um baixo nível da substância testada. Além de ser um ensaio de curto prazo com muitas vantagens: baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular (BELCAVELLO et al., 2012; BONCIU et al., 2018).

Figura 1. Sistema teste *Allium cepa*.



Fonte: Arquivo pessoal

O sistema teste de *A. cepa* é legitimado como um ótimo teste para análise e monitoramento *in situ* de substâncias químicas do ambiente pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999).

É importante na avaliação principalmente de extratos e infusões de plantas medicinais, utilizando a espécie popularmente conhecida por cebola que apresenta um excelente potencial bioindicador. Os resultados encontrados do índice mitótico e as aberrações cromossômicas das

células meristemáticas de *A. cepa* geralmente são usados para alertar a população sobre o consumo do produto (TEDESCO & LAUGHINGHOUSE & HAYWOOD, 2012; FIRBAS & AMON, 2013).

1.3 ESPÉCIES SELECIONADAS

1.3.1 *Mimosa setosa* Benth var. *paludosa* Benth Barn (Fabaceae)

A espécie *M. setosa* (**Figura 2**), é uma planta daninha caracterizada pelo hábito arbusto-subarbustivo, com principal distribuição nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste (DUTRA & MORIM, 2015), facilmente encontradas habitando ambientes antropizados (FARIA et al., 2013), apresentando características desejáveis para a recuperação de áreas degradadas (DUTRA & MORIM, 2014).

Figura 2. *Mimosa setosa* benth var. *paludosa* benth barn (Fabaceae)



Fonte: Plantas do Brasil - <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/search?q=mimosa+setosa>

De acordo com Nau e Seegnani (1997), ela possui um rápido crescimento e recobrimento do solo, ótima capacidade de fixação de nutrientes, maiormente o nitrogênio e auxilia

contra a ação de plantas invasoras. Além do mais, algumas populações utilizam de suas folhas para fins medicinais, realizando chá para dormir (FILHO et al., 2012).

Nos estudos de Lima (2018), o extrato aquoso de *M. setosa* apresentou efeitos alelopáticos inibitórios sobre a germinação, retardou o crescimento e o perfil germinativo de *Lactuca sativa* L. (Alface). Apresentando assim a importância de realizar estudos de citotoxicidade e genotoxicidade com essa espécie, para conhecer qual é o efeito do seu extrato a nível celular e quais danos podem causar.

1.3.2 *Tilesia baccata* (L.F) Pruski (Asteraceae)

Tilesia baccata (L.F) Pruski (**Figura 3**) possui ampla distribuição no Brasil, sendo encontrada na região norte nos estados do Acre, Rondônia, Roraima, Tocantins, Amapá, Amazonas e Pará. Seu hábito é considerado arbustivo ou subarbustivo (MAGENTA, 2015). Conhecido popularmente como olho de camarão compõe a lista de plantas não convencionais utilizadas para fins alimentícios em algumas comunidades (CHAVES, 2016).

Figura 3. *Tilesia baccata* (L.f.) Pruski (Asteraceae)



Fonte: SOUSA, 2018.

Além de ser utilizada para métodos medicinais em Guiana, Suriname e Guiana Francesa, com as suas folhas realizam uma decocção como antidiabético e também para diminuir febre, utilizam as flores em infusão para curar gripe, além de acreditarem que possui elementos para curar manchas na pele através de banho de ervas (DEFILIPPS et al., 2004).

De acordo com Souza (2018), o extrato aquoso de *T. baccata* implica atividade alelopática inibindo o desenvolvimento do hipocótilo e radícula de *Lactuca sativa* L. (Alface) e interferiu na morfologia radicial das plântulas. Por ser comestível e muito utilizada na medicina popular em algumas regiões, é de suma importância a realização de estudos de citotoxicidade para se conhecer quais problemas o extrato de *T. baccata* pode ocasionar a nível celular.

1.3.3 *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng (Malvaceae)

A espécie *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (**Figura 4**) pode ser encontrado nas florestas tropicais do hemisfério sul, do México a Floresta Amazônica Meridional (CUATRECASAS, 1964). Apesar das suas tradicionais áreas de ocorrências, *T. Speciosum* é pouco conhecido, mesmo possuindo um alto potencial para ser utilizado no consumo humano (SILVA & VENTURIERI & FIGUEIRA, 2004).

Figura 4. *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (Malvaceae)



Fonte: SILVA, 2018

Conhecido popularmente como Cacauí ou Cacao do mato, é utilizado como recurso alimentício, medicinal, aromático e ornamental por algumas comunidades tradicionais (MACHADO et al., 2008). O Cacauí também é usado em sistemas agroflorestais e sistemas de reflorestamento no Acre, apresentando 12,33% de uso e importância nestes sistemas (PEQUENO & OLIVEIRA & MARQUES, 2016).

Silva (2018), avaliou o potencial alelopático do *T. speciosum* a partir do extrato aquoso de suas folhas, os resultados demonstraram um estímulo no crescimento do hipocotilo e radícula da espécie-alvo *Lactuca sativa*(Alface) e *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) nas menores concentrações testadas, na concentração de 100mg/ml o extrato proporcionou uma inibição do crescimento radicular e do hipocótilo de Alface. Apresentando assim uma grande importância em realizar uma pesquisa sobre suas atividades citotóxicas, para compreender quais efeitos as suas maiores concentrações causam em células e observar os estímulos que seu extrato pode causar, ao analisar a quantidade de fases em mitose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial citotóxico e genotóxico de extratos aquosos de *Mimosa setosa* Benth var. *paludosa* Benth Barn (Fabaceae), *Tilesia baccata* (L.F) Pruski (Asteraceae) e *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng (Malvaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos extratos vegetais sobre o índice mitótico de células meristemáticas radiculares de cebola (*Allium cepa*);
- Verificar se os extratos vegetais são capazes de induzir alterações cromossômicas em *Allium cepa*;
- Fornecer subsídios para estudos posteriores que objetivem o desenvolvimento de fármacos e/ou herbicidas naturais.

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA DO MATERIAL

Foram coletadas como material vegetal das espécies selecionadas folhas jovens, totalmente expandidas e não danificadas. A coleta das folhas da *M. setosa* ocorreu no Loteamento Terras de Bonanza em Altamira-PA (3°10'38.8"S 52°10'09.0"W). As folhas de *T. baccata* e *T. speciosum* foram coletadas em uma área rural da cidade de Altamira-PA (3°29'08.1"S 52°22'224.8"W). Após as coletas, os materiais foram levados para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará do *Campus* Universitário de Altamira, acondicionados em sacos plásticos e colocados no freezer (-20 °C) até sua utilização.

3.2 PREPAROS DOS EXTRATOS

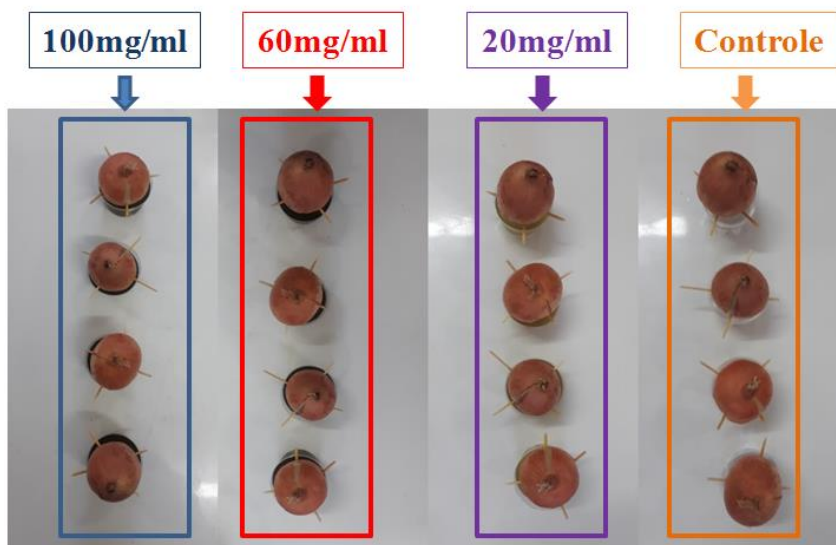
Para o preparo dos extratos aquosos das folhas o material vegetal de cada espécie (80 gramas) foi triturado em liquidificador juntamente com 800 mL de água destilada autoclavada, em seguida o material foi filtrado em papel filtro, coberto com papel alumínio e deixado em descanso por 17 horas. A partir do extrato obtido (concentração de 100 mg/mL) foram realizadas as diluições de 60 mg/mL e 20 mg/mL do extrato em água destilada autoclavada. Como controle foi utilizada água destilada a fim de servir como referência-padrão às variáveis que foram submetidas aos outros tratamentos (OLIVEIRA et al., 2014; MIRANDA et al., 2015).

3.3 BIOENSAIOS

Foram realizados três bioensaios, um para cada espécie vegetal, utilizando o sistema teste *Allium cepa*. Em cada um dos bioensaios foram utilizados 25 bulbos de cebola com tamanhos aproximados, os quais permaneceram em contato com frascos contendo água destilada durante três dias para enraizamento. Após este período, os nove bulbos que apresentaram comprimento radicular mais divergente foram descartados.

Foram utilizados como tratamentos, em cada bioensaio, três concentrações do extrato (100, 60, 20 mg/mL), mais o grupo controle. Em cada tratamento foram utilizados quatro bulbos previamente submetidos ao enraizamento com água destilada, os quais permaneceram com suas raízes imersas em um dos tratamentos durante 72 horas em uma temperatura de 25 °C (**Figura 5**).

Figura 5. Esquema de um bioensaio. (Bulbos de cebolas em contato com extrato e suas respectivas concentrações)



Fonte Arquivo pessoal

Para o preparo das lâminas, cinco raízes de cada bulbo foram retiradas (totalizando 20 raízes por tratamento) e submetidas aos procedimentos propostos pela metodologia descrita por Guerra e Souza (2002):

- a) Fixadas em Carnoy 3:1 por duas horas;
- b) Lavadas com água destilada duas vezes durante dez minutos;
- c) Transferidas para o HCL 5N por vinte minutos para a realização da hidrólise;
- d) Lavadas três vezes com água destilada por quinze minutos;
- e) Mantidas em recipiente fechado contendo o corante hematoxilina a 1% por 30 minutos;
- f) Cada raiz foi colocada em uma lâmina juntamente com uma gota de ácido acético a 45% e coberta por uma lamínula;

Resultando em 20 lâminas observadas por cada concentração, sendo 80 lâminas por bioensaio. Na objetiva de 40x foram analisadas 4.000 células por cada concentração com o auxílio de microscópio biológico trinocular com fluorescência, design BX2 da marca Motic Instruments, modelo BA410FL juntamente com a câmera XCAM Family 1080P HDMI+USB Output e o programa computacional ImageView.

3.4 ANÁLISES DE DADOS

O teste de citotoxicidade avaliou a frequência de cada uma das fases da mitose e o índice mitótico (IM) através da seguinte equação: $IM = (m/T) \times 100$. Sendo que m= número de células em mitose; T =número total de células. No teste de genotoxicidade foi avaliado o índice de alterações cromossômicas através da equação: $IG = (g/T) \times 100$, sendo “g” o número de células com alterações cromossômicas e “T” o número total de células (PIRES et al., 2001). Os resultados obtidos nos testes foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (MAROCÔ, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 MIMOSA SETOSA BENTH VAR.PALUDOSA BENTH BARN

Ao realizar as análises de citotoxicidade das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas aos tratamentos do extrato aquoso de *Mimosa setosa* foi possível observar que no tratamento controle a fase mais encontrada foi a telófase e em 20 mg/mL a fase mais identificada foi a metáfase, nas concentrações de 60 e 100mg/mL foram detectadas em maiores quantidades prófases e não apresentaram nenhuma célula em outras fases da divisão celular nessas duas concentrações (**Tabela 1**). As células em diferentes fases da mitose encontradas estão quantificadas na tabela 1.

Tabela 1. Número de células em fases da mitose submetidas ao extrato aquoso de *M. setosa* e o índice mitótico (IM) de cada tratamento. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
CONTROLE	3.742a	56a	79a	39a	84a	6,45a
20 MG/ML	3.793b	44a	82a	33a	48b	5,17a
60 MG/ML	3.971c	29a	0b	0b	0c	0,72b
100 MG/ML	3.974c	26a	0b	0b	0c	0,65b

Nos tratamentos controle e 20 mg/mL verificou-se células em diferentes fases da mitose (**Figura 6**), diferentemente das concentrações 60 e 100 mg/mL que foi possível observar apenas células em prófase (**Figura 7 e 8**), ocorrendo uma inibição total da divisão celular a partir desta fase. Portis et al. (2016) acreditam que o fato de encontrar células apenas em prófases, indica uma inibição das próximas fases da mitose, fazendo com que o número de células nesse estágio aumente. Este efeito é denominado de citostático e pode ocasionar apoptose celular (BELTRÁN & BELTRÁN, 2016).

Figura 6. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas aos tratamentos controle e/ou 20 mg/mL do extrato aquoso das folhas de *M. setosa*. a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.Telófase

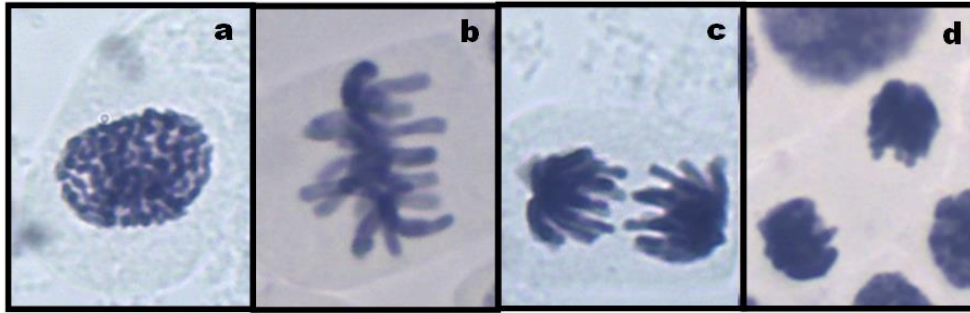


Figura 7. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à concentração 60 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. a.Prófase.

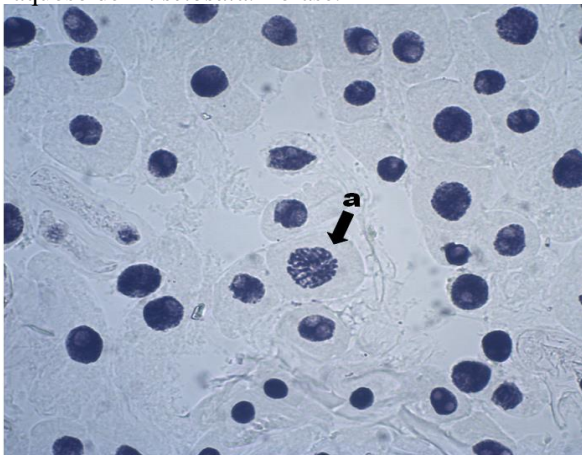
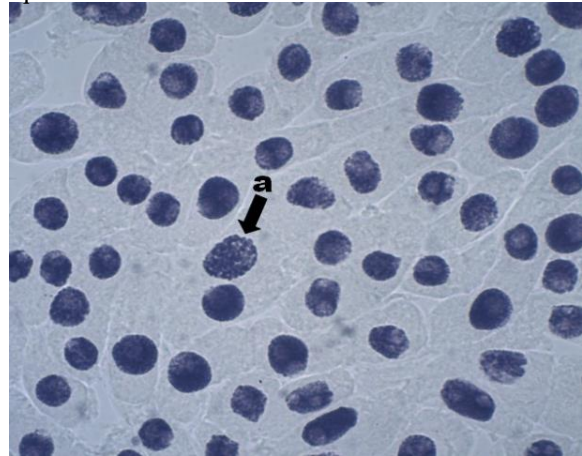


Figura 8. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à concentração 100 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. a.Prófase.



Ao realizar as análises do índice mitótico (IM) das células submetidas ao extrato aquoso de *M.setosa* foi possível observar que o tratamento controle apresentou o maior IM, seguindo de 20 mg/mL, as concentrações de 60 e 100 mg/mL apresentaram inibições dos seus índices mitóticos, ambos sendo significativamente diferentes do controle e 20 mg/mL. Ocorreu diminuição no IM de acordo com o aumento das concentrações (**Tabela 1**). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Borges et al. (2011) que ao avaliar os efeitos citotóxicos do extrato aquoso das folhas secas de *Ricinus communis* o controle divergiu das outras concentrações de modo crescente.

Bezerra e Oliveira (2016) ao realizarem a análise do potencial citotóxico do infuso de malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* também obtiveram resultados semelhantes, as maiores concentrações estudadas teve uma redução do índice mitótico se comparado ao controle.

A inibição da mitose das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* é utilizada como um índice de toxicidade. Portanto, as concentrações de 60 mg/mL e 100 mg/mL do extrato aquoso das folhas de *M. setosa* possui atividades citotóxica sobre as células meristemáticas de *A. cepa* e citostática por inibirem as fases posteriores da prófase.

Ao analisar as células com alterações cromossômicas submetidas às diferentes concentrações do extrato aquoso de *M. setosa*, foram encontradas algumas células com anormalidades mitóticas que estão quantificadas na tabela 2, foi possível observar no tratamento controle e na concentração de 20 mg/mL (**Figura 9 e Tabela 2**) que foi de modo mais expressivo, tendo uma diferença significativa do seu índice de alterações cromossômicas (IG) em relação ao controle (**Tabela 2**). As maiores concentrações tiveram baixos índices mitóticos a partir da prófase, portanto, não apresentaram alterações cromossômicas.

Tabela 2. Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos tratamentos do extrato aquoso de *M. setosa*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	20 MG/ML	60 MG/ML	100 MG/ML
Prófase irregular	0	3	0	0
Metáfase irregular	0	10	0	0
Metáfase com aderência cromossômica	0	21	0	0
Metáfase com perda de cromossomos	0	4	0	0
Metáfase com cromossomo em anel	0	1	0	0
Anáfase irregular	2	9	0	0
Ponte anafásica	4	17	0	0
Anáfase com perda de cromossomos	0	3	0	0

(Continua)

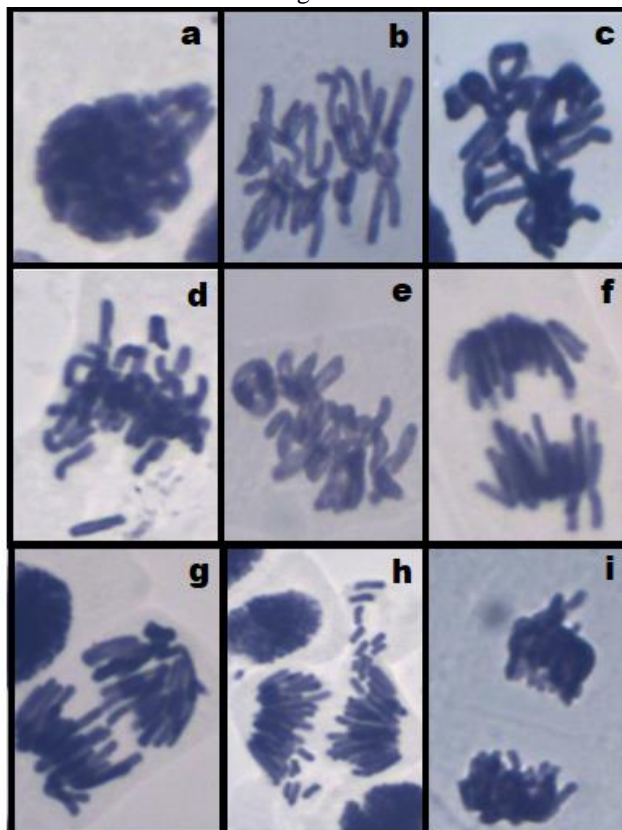
(Continuação)

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	20 MG/ML	60 MG/ML	100 MG/ML
Telófase irregular	4	10	0	0
IG	0,25a	1,95b	0a	0a

Ao realizar a análise do potencial genotóxico de *Plectranthus barbatus* sobre as células meristemáticas de *A. cepa*, Bezerra e Oliveira (2016) obtiveram resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho, a concentração intermediária foi a que apresentou o maior índice de células com alterações cromossômicas de modo significativo em relação ao controle.

De acordo com Yuet Ping et al. (2012) os baixos índices mitóticos das maiores concentrações podem estar relacionados a um efeito genotóxico do extrato. As ações genotóxicas de compostos químicos resultam em alterações cromossômicas (NATARAJAN, 2002). A quantidade de alterações encontradas (**Tabela 2**) mostra que o tratamento de 20 mg/mL induziu as alterações.

Figura 9. Células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas submetidas à concentração de 20 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. a.Prófase irregular. b.Metáfase irregular. c.Metáfase com aderência cromossômica. d.Metáfase com perda de cromossomo. e.Metáfase com cromossomo em anel. f.Anáfase irregular. g.Ponte anafásica. h.Anáfase com perda de cromossomo. i.Telófase irregular.



As aderências cromossômicas, pontes anafásicas e perdas de cromossomos ocorrem devido ao efeito do extrato no fuso mitótico e resultam em distúrbios na divisão celular. Pontes anafásicas indicam o efeito clastogênico causados pelas quebras cromossômicas, as perdas de cromossomos e aderências cromossômicas aumentam o risco de aneuploidia (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

A alteração mais encontrada foi a metáfase com aderência cromossômica (**Tabela 2**). De acordo com Mercykutty e Stephen (1980) essa aderência pode ocorrer devido à despolimerização do DNA, dissolução parcial de nucleoproteínas, quebra e troca das unidades básicas de fibras dobradas das cromátides e a remoção da cobertura proteica do DNA nos cromossomos.

Segundo Fiskesjö (1985), os cromossomos com aderências é um efeito irreversível e altamente tóxico, que pode ocasionar a morte celular. Essa aderência do DNA tem sido correlacionado com alta taxa de formação de tumores em algumas populações humanas (WYNDER & HALL & PELANSKY, 1983)

Além das alterações cromossômicas encontradas, também foi possível notar diversas células em apoptose que podem possivelmente terem sido causadas pelo extrato, nas concentrações de 60 (**figura 10**), 100 mg/mL (**figura 11**) e em 20 mg/mL (**figura 13**) em menor quantidade. A apoptose é conhecida como morte celular programada, mas ela não descreve um caminho de morte celular, mas sim um fenótipo que consiste em fragmentação da membrana plasmática, condensação nuclear da cromatina, fragmentação genômica do DNA, entre outras coisas (ORRENIUS & NICOTERA & ZHIVOTOVSKY, 2011).

Figura 10. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à concentração 60 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. As setas a.; b. e c. indicam células em apoptose.

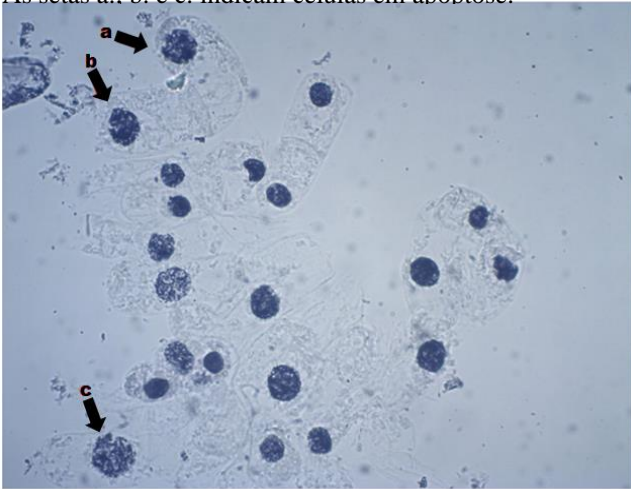


Figura 11. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à concentração 100 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. As setas a.; b.; c.; d.; e.; e f indicam células em apoptose.

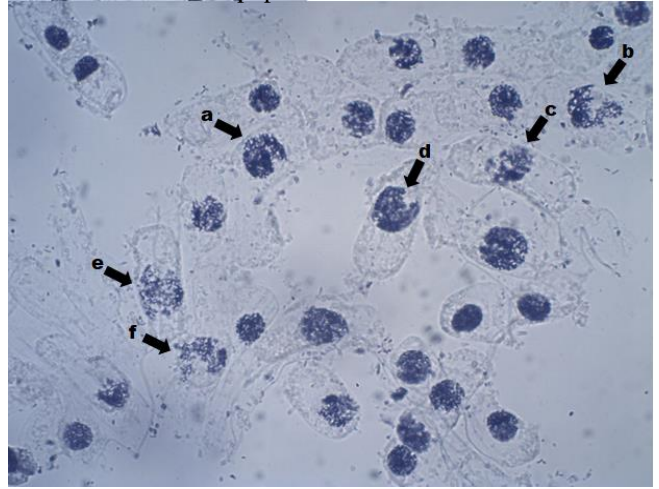
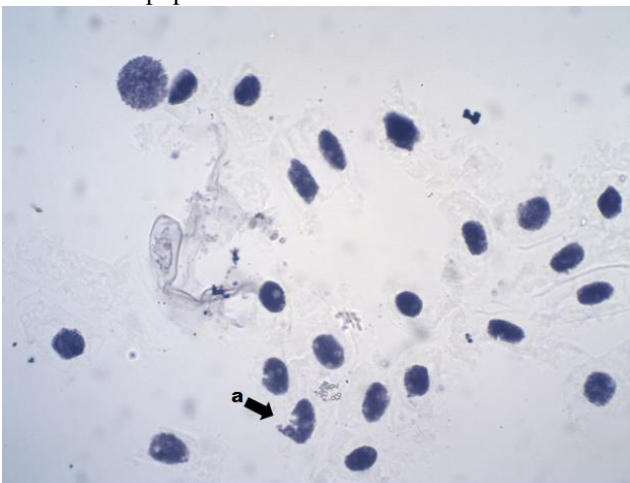


Figura 12. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à concentração 20 mg/mL do extrato aquoso de *M. setosa*. a. Célula em apoptose.



A morte celular pode ser ocasionada por traumas físicos, toxinas, temperaturas excessivas, substâncias químicas e etc. Podem ocorrer por duas vias, a extrínseca e intrínseca, ambas as vias resultam em um final comum, que envolve a ativação das caspases que clivam moléculas regulatórias e estruturais, ocasionando a morte da célula (GALLUZZI et al., 2012; MICHIE et al., 2019).

A utilização inadequada dessas substâncias químicas que causam apoptose pode causar diversos problemas para a saúde humana (CHACON et al., 2002). Apesar disso as moléculas ativas

contidas nesses extratos podem ser utilizadas como agente anticâncer, pois a indução de apoptose é um dos marcadores mais importantes dos agentes antitumorais citotóxicos, pois seus compostos químicos induzem vias apoptóticas que são frequentemente bloqueadas por células cancerígenas (DE ARAÚJO JÚNIOR et al., 2012; GREEN & LLAMBI, 2015).

Estudos demonstraram que os extratos de *Phyllanthus emblica* L. são citotóxicos e inibem a proliferação *in vitro* de muitas linhas de células tumorais, como MK-1 (adenocarcinoma gástrico humano) e B16F10 (melanoma murino) (ZHANG et al., 2004). Vários compostos fenólicos isolados do extrato de *P. emblica* são responsáveis pelo seu componente antiproliferativo, inibindo a proliferação de células de câncer de pulmão humano, induzindo a parada e apoptose do ciclo celular da fase G2/M (KHAN et al. 2002).

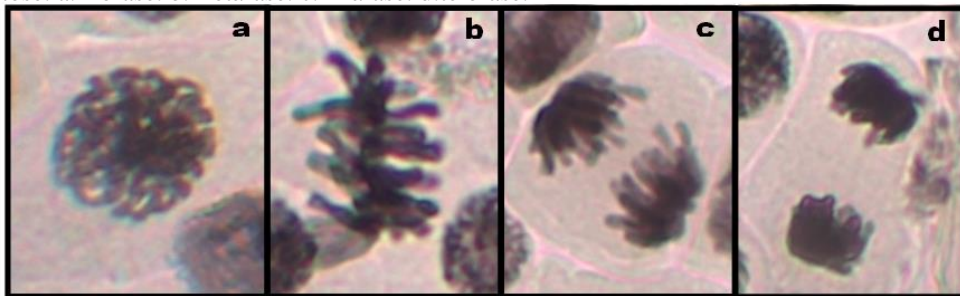
É necessário ressaltar que quando se nota uma possível indução de apoptose é de suma importância um maior refinamento técnico para que haja a comprovação e a quantificação, para isso, é recomendado a utilização de testes, como o de hipertermia de campo magnético (MFH) que utiliza de calor gerado em nanopartículas magnéticas por campos magnéticos variáveis no tempo, para transformar perdas de energia, induzidas pela variação temporal campo, em uma fonte localizada de calor e assim analisar o processo de morte celular em tempo real (BLANCO-ANDUJAR et al., 2016).

Portanto, o extrato aquoso das folhas de *M. setosa* apresenta potencial citotóxico e genotóxicos nas suas concentrações de 60 mg/mL e 100 mg/mL e genotóxicos na concentração de 20 mg/mL ocasionando diversas alterações cromossômicas. Inibi a divisão celular a partir da prófase nas concentrações de 60 mg/mL e 100 mg/mL podendo ser capaz de levar as células a apoptose, tornando o consumo desse extrato perigoso para a saúde humana e potencial para uso na medicina e na agroecologia.

4.2 *TILESIA BACCATA* (L.F) PRUSKI

Ao analisar as células meristemáticas de *A. cepa* submetidas às respectivas concentrações do extrato aquoso das folhas de *T. baccata* foi possível observar que em todos os tratamentos a fase mitótica mais encontrada foi a prófase, mas também foi possível observar todas as outras fases dentro os tratamentos (**Figura 13 e Tabela 3**). Os números de células em cada fase da divisão celular dentro dos tratamentos estão quantificados na tabela 3. Mota et al. (2017) avaliaram o potencial citotóxico dos extratos de duas espécies botânicas do cerrado de uso medicinal por meio do sistema teste *Allium cepa* e notaram a presença de prófase com maior frequência ao comparar as diferentes fases da mitose dentro de todos tratamentos testados.

Figura 13. Células meristemáticas de *A. cepa* submetidas ao extrato aquoso das folhas de *T. baccata* em diferentes fases da mitose. a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.telófase.



O tratamento controle foi o que apresentou um maior índice mitótico (IM) seguindo de 60 mg/mL que não divergiram entre si. A menor concentração (20 mg/mL) juntamente com a maior (100 mg/mL) tiveram uma inibição do índice mitótico, sendo o menor IM o da concentração de 100 mg/mL, ambos diferiram significativamente de 60 mg/mL e do controle (**Tabela 3**).

Tabela 3. Número de células em fases da mitose e o índice mitótico (IM) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. baccata*. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
CONTROLE	3.769a	83a	78a	49a	21a	5,75a
20 MG/ML	3.914a	43a	26b	8b	9a	2,15b

(Continua)

(Continuação)

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
60 MG/ML	3.783a	69a	62a	42a	44b	5,42a
100 MG/ML	3.948a	17b	15b	7b	13a	1,3b

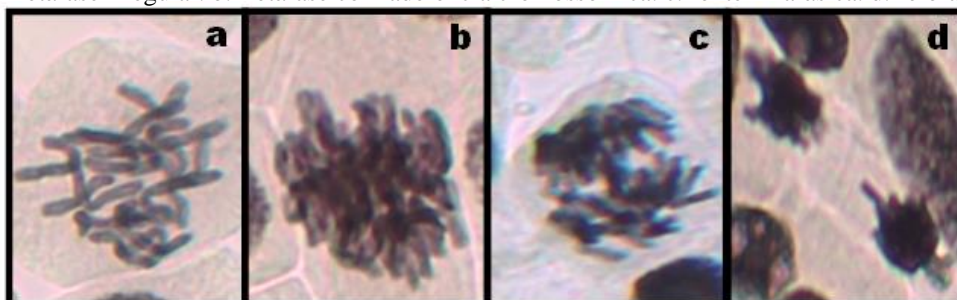
Bagatini et al. (2007) ao avaliarem os efeitos citotóxicos das infusões de *Solidago microglossa* DC. no ciclo celular de *Allium cepa* a maior concentração utilizada da infusão foi a que teve a maior diminuição do índice mitótico em relação ao controle, resultado semelhante ao encontrado com a *T. baccata*, mas se diferiu em partes, a menor concentração não ocasionou inibição no índice mitótico.

Segundo Rosenthal e Berenbaum (2012) as ações dos metabólitos secundários podem variar nas suas intensidades e da resposta do bioindicador utilizado, o efeito de um extrato vegetal depende da sua concentração, não necessariamente precisa ser alta para poder influenciar em uma maior ou menor atividade biológica.

Souza (2018) avaliou o potencial alelopático de extratos de *Tilesia baccata* e constatou que o extrato aquoso de suas folhas apresentou atividade inibitória sobre o crescimento radicular da planta alvo, em todas as concentrações utilizadas. Os resultados encontrados nesse trabalho reafirmam o perfil observado por Souza (2018), no qual as concentrações de 20 e 100 mg/mL causaram redução no índice mitótico e conseqüentemente do crescimento.

Algumas alterações cromossômicas foram encontradas em todas as concentrações testadas, foi possível observar metáfases irregulares, metáfases com aderência de cromossomos, pontes anafásicas e telófases irregulares (**Figura 14 e Tabela 4**).

Figura 14. Células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas submetidas ao extrato aquoso de *T. baccata*. a.Metáfase irregular. b.Metáfase com aderência cromossômica. c.Ponte Anafásica. d.Telófase irregular.



As anormalidades cromossômicas encontradas estão quantificadas na tabela 4, onde também é possível observar que o índice dessas alterações cromossômicas (IG) encontradas não tiveram diferenças estatísticas em relação ao controle.

Tabela 4. Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. baccata*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	20 MG/ML	60 MG/ML	100 MG/ML
Metáfase irregular	1	3	1	1
Metáfase com aderência cromossômica	4	4	4	5
Ponte anafásica	7	5	2	4
Telófase irregular	4	1	1	4
IG	0,4a	0,32a	0,27a	0,27a

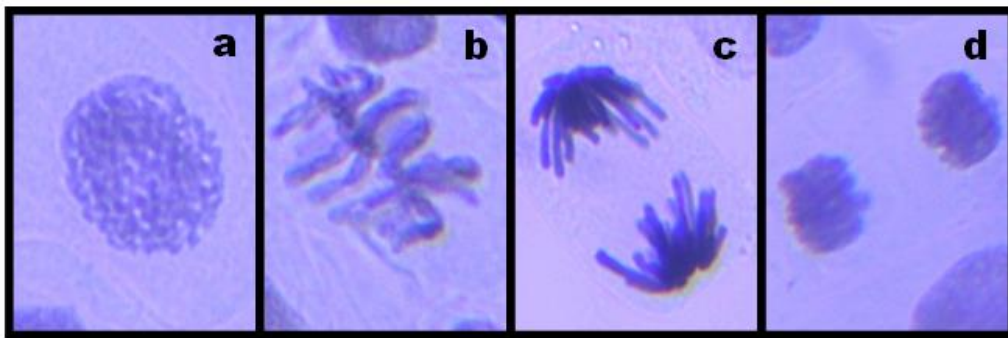
Os mesmos resultados foram encontrados nos trabalhos de Peron et al. (2008) que ao realizarem a avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl em sistema teste vegetal, das três infusões utilizadas, nenhuma apresentou alterações cromossômicas significativas e de Bagatini et al. (2009) que ao realizarem a análise dos efeitos citotóxicos de infusões (chá) de *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) no ciclo celular de *Allium cepa*, os resultados demonstraram efeito citotóxico, porém não apresentaram atividade genotóxica.

Portanto, o extrato aquoso de *T. baccata* apresenta um potencial citotóxico nas concentrações de 20 e 100 mg/mL, inibindo o índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* L. de modo significativo, porém nenhuma das concentrações testadas apresentaram alterações cromossômicas significativas, portanto, não possuem efeitos genotóxicos.

4.3 THEOBROMA SPECIOSUM WILLD EX SPRENG

Ao analisar as células meristemáticas de *A. cepa* submetidas às respectivas concentrações do extrato aquoso das folhas de *T. Speciosum* foi possível observar todas as fases da mitose em todos os tratamentos (**Figura 15 e Tabela 5**), mas entre as fases encontradas a metáfase foi a mais frequente, seguindo da prófase. As quantidades de células analisadas em divisão celular estão quantificadas na tabela 5.

Figura 15. Células meristemáticas de *A. cepa* em divisão celular, submetidas ao extrato aquoso das folhas de *T. speciosum*. a.Prófase. b.Metáfase. c.Anáfase. d.Telófase.



Com as análises do índice mitótico (IM) podemos observar que o tratamento controle foi o que apresentou o maior índice mitótico (IM), seguindo de 20 mg/mL, as duas concentrações não divergiram significativamente entre si, houve uma diminuição acentuada do IM nas concentrações de 60 mg/mL e 100 mg/mL, que diferiram significativamente do controle e 20 mg/mL (**Tabela 5**).

Tabela 5. Número de células em fases da mitose e o índice mitótico (IM) submetidas ao extrato aquoso de *T. speciosum*. Médias na vertical seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
CONTROLE	3.790a	54a	86a	27a	43a	5,2a
20 MG/ML	3.820a	54a	70a	32a	24ab	4,5a
60 MG/ML	3.956b	14b	16b	7b	7bc	1,1b

(Continua)

(Continuação)

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
100 MG/ML	3.952a	18b	19b	10b	3c	1,25b

Sturbelle et al. (2010) ao Avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* a dose menos concentrada de *A. vera* não diferiu do controle, mas a maior concentração causou alterações significativas. *A. vera* numa dose mais concentrada diminui o índice mitótico de *Allium cepa*, enquanto que nas menores doses, não causa diminuição do IM, não sendo estatisticamente diferente do controle, resultado semelhante ao deste trabalho.

Adegbite e Sanyadu (2009) obtiveram resultados semelhantes ao analisarem a citotoxicidade do extrato aquoso de folha amarga *Vernonia amygdalina* usando o teste *Allium cepa* observaram que os valores do índice mitótico foram menores nas maiores concentrações da solução aquosa do extrato das folhas de *V. Amygdalina*.

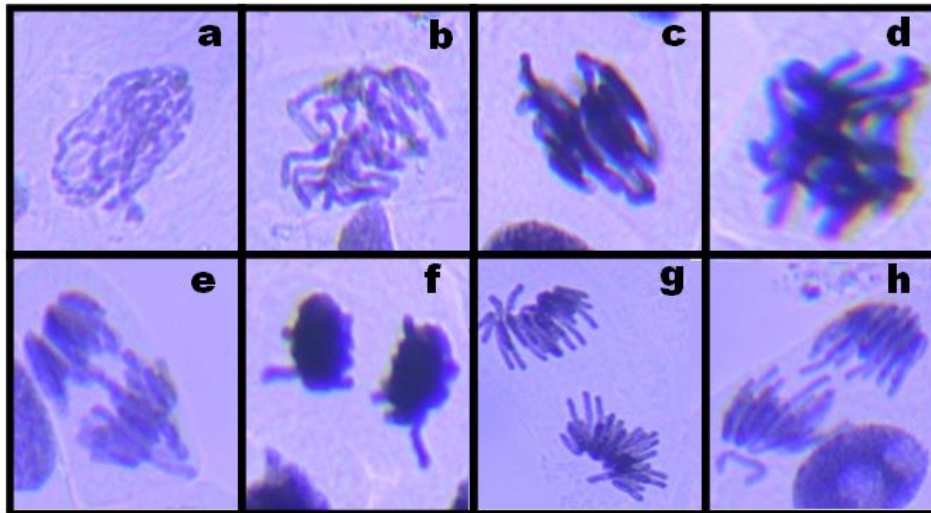
Ancia e Romão (2015) ao avaliarem a atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *A. Cepa*, as maiores concentrações também foram as que apresentaram os menores índices mitóticos. Campoto et al. (2002) ao analisarem o efeito das infusões de *Maytenus ilicifolia* Mart. e *Bauhinia candicans* em células meristemáticas das raízes de *A. Cepa* Também obtiveram esse mesmo resultado, o IM diminuiu nas maiores concentrações.

Silva (2018), ao realizar a avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de *T. speciosum* sobre o crescimento da radícula de *Lactuca sativa* L., a concentração de 100 mg/mL apresentou inibição no crescimento, quando comparado ao controle. Essa interferência no crescimento pode ser relacionada a redução do índice mitótico que foi corroborado neste trabalho.

Nas análises do índice de genotoxicidade (IG) foram encontradas algumas células com alterações cromossômicas em todas as concentrações, sendo possível observar alterações como

prófases irregulares, metáfases irregulares, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases mirregulares, pontes anafásicas, anáfase com perda cromossômica e telófase irregular como mostra a figura 16. Essas anomalias estão quantificadas na tabela 6.

Figura 16. Células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas submetidas ao extrato aquoso das folhas de *T. speciosum*. a.Prófase irregular. b.Metáfase irregular. c.Metáfase com aderência cromossômicas. d.Metáfase com aderência cromossômicas. e.Ponte anafásica. f.Telófase irregular. g.Anáfase irregular. h.Anáfase com perda cromossômica.



Essas alterações foram encontradas de forma mais acentuada na concentração de 20 mg/mL, apesar de ter sido encontradas essas anomalias cromossômicas, em nenhuma concentração o IG divergiu significativamente do controle (**Tabela 6**).

Tabela 6. Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos respectivos tratamentos do extrato aquoso de *T. speciosum*. Médias na horizontal seguidas por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	20 MG/ML	60 MG/ML	100 MG/ML
Prófase irregular	1	2	0	1
Metáfase irregular	0	3	1	4
Metáfase com aderência cromossômica	1	6	5	7
Anáfase irregular	1	5	1	2
Ponte anafásica	5	9	2	2

(Continua)

(Continuação)

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS			
	CONTROLE	20 MG/ML	60 MG/ML	100 MG/ML
Anáfase com perda de cromossomos	1	0	0	0
Telófase irregular	0	1	1	1
IG	0,2a	0,65a	0,42a	0,42a

Sabini et al. (2011) ao avaliar as atividades citotóxicas e genotóxicas do extrato aquoso frio obtido de *A. saturoioides* usando o teste *Allium cepa* L, os resultados demonstraram a presença de potencial citotóxico nas maiores concentrações e ausência de potencial de genotoxicidade do extrato. Freitas et al. (2014) ao realizar a prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock, as concentrações do extrato apresentaram potencial citotóxico, mas também não apresentaram ações genotóxicas. Resultados iguais ao encontrado com *T. speciosum*.

Portanto, o extrato aquoso de *T. speciosum* apresenta potencial citotóxico nas maiores concentrações testadas neste trabalho (60 mg/mL e 100 mg/mL), porém não apresenta potencial genotóxico nas células meristemáticas de *A. cepa*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato aquoso das folhas de *Mimosa setosa* promoveu alterações citotóxicas e genotóxicas, em diversos parâmetros, tais como, redução do índice mitótico, atividade citostática, indução de alterações cromossômicas e de apoptose celular. Os resultados sugerem que a ingestão usual da espécie, como chá, pode representar riscos para a saúde humana. Além disso, *M. setosa* apresentou potencial para ser utilizada como herbicida natural e agente antiproliferativo.

Os resultados apresentados pelos extratos aquosos das folhas de *Tilesia baccata* e *Thebroma speciosum* demonstraram atividades citotóxicas moderadas, evidenciando a necessidade de maior cautela na utilização dessas espécies para fins medicinais.

6. REFERÊNCIAS

- ADEGBITE, A. E.; SANYAOLU, E. B. Cytotoxicity testing of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Scientific Research and Essays**, v. 4, n. 11, p. 1311-1314, 2009.
- ANCIA, J. P.; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, 2016.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v.6, n.11, p. 1720-1731, 2011.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.
- BENNETT, R.; WALLSGROVE, R. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.13, n. 4, p. 220-228, 2016.
- BELTRÁN, O. R. A.; BELTRÁN, C. P. M. Regulación del ciclo celular (CC) de *Vicia faba* L por el extracto alcohólico de *Annona cherimola* Mill" chirimoya. **Scientia Agropecuaria**, v. 7.SPE: 245-251, 2016.
- BLANCO-ANDUJAR, C.; ORTEGA, D.; SOUTHERN, P.; NESBITT, S. A.; THANH, N. T. K.; PANKHURST, Q. A. Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 11, n. 2, p.121-136, 2016.
- BONCIU, E.; FIRBAS, P.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARAISSMAILIÖĞLU, M. C.; LIU, D.; SCHIFF, S. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.
- BORGES, C. D. S.; CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.
- CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **MutationResearch/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bonemarrow cells. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.
- CARVALHO-OLIVEIRA, R.; POZO, R. M. K.; LOBO, D. J. A.; LICHTENFELS, A. J. F. C.; MARTINS-JUNIOR, H. A.; BUSTILHO, J. O. W. V.; SALDIVA, P. H. N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 1-7, 2005.
- CHAVES, M. S. Plantas alimentícias não convencionais em comunidades ribeirinhas na amazônia. 2016. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de Viçosa**, 123 p., 2016.
- CHACON, D.; DALLA LIBERA, A. N.; CINTRA, D. E. C.; CARVALHO, J. C. T.; DE OLIVEIRA, G. A.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic and antigenotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wistar rats. **Cytology**, v. 67, n. 4, p.417-22, 2002.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, v. 24, p. 1250-1319, 2000.
- CUATRECASAS, J. Cacao and its allies A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**. v. 35, p. 379-614, 1964.
- DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; DE SOUZA, T. P.; PIRES, J. G. L.; SOARES, L. A. L.; DE ARAÚJO, A. A.; PETROVICK, P. R.; GUERRA, G. C. B. A dry extract of *Phyllanthus niruri* protects normal cells and induces apoptosis in human liver carcinoma cells. **Experimental biology and medicine**. v. 237, n. 11, p. 1281-1288, 2012.
- DEFILIPPS, R.A; SHIRLEY, L. CREPIN, M.; CREPIN, J. medicinal plants of the guianas (Guyana, Surinam, French guiana). **Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution**. Washington, D.C. 20013-7012, 491p., 2004.
- DELGODA, R.; MURRAY, J. E. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In: **Pharmacognosy**. Academic Press. p. 93-100, 2017.
- DE SOUZA, R. C. M.; JÚNIOR, W. S. E. Seleção e obtenção de extratos de plantas para utilização no controle de pragas na agricultura familiar. **Revista Agroecossistemas**, 2013, 1.1: 27-27.
- DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. 2014 *Mimosa* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23084>>, Acesso em 14 de maio de 2019.
- DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. 2015 *Mimosa* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

16

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23092> >, Acesso em 14 de maio de 2019.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.

FARIA, J. C. T.; CALDEIRA, M. V. W.; DELARMELINA, W. M.; GONÇALVES, E. O. Uso de resíduos orgânicos no crescimento de mudas de *Mimosa setosa*. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 409-418. 2013.

FILHO, E. M. C. **Plante as árvores do Xingu e Araguaia**. -- Ed. rev. e ampl.-- São Paulo : Instituto Socioambiental, 2012.

FIRBAS, P; AMON, T. Allium chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 4, n. 4, p. 189, 2013.

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

FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; MATSUBARA, E. Y.; DE LIMA, J. C.; ROSOLEN, J. M.; TAKAHASHI, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Quim. Nova**, v. 35, n.3, p.571-580, 2012.

FREITAS, J. V.; BATITUCCI, M. D. C. P.; ANDRADE, M. A.; DA LUZ, A. C.; PEREIRA, U. J. Prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2015.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H; BLAGOSKLONNY, M. V.; GOTTLIEB, E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n.1, p. 107, 2012.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 12, 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002.

GUIMARAES, E. T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; CALDINI, N.; LOBO, D.J.; LICHTENFELS, A.J.; SALDIVA, P.H. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2000.

HUSSAIN, M. S.; FAREED, S.; SABA ANSARI, M.; RAHMAN, A.; AHMAD, I. Z.; SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 1, p. 10, 2012.

- KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol.** v. 2, p. 377-392, 2014.
- KHAN, M. T.; LAMPRONTI, I.; MARTELLO, D.; BIANCHI, N.; JABBAR, S.; CHOUDHURI, M. S. K.; GAMBARI, R. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medicinal plant *Emblca officinalis*: effects on in vitro cell growth of human tumor cell lines. **International journal of oncology**, v. 2, n. 1, p. 187-192, 2002.
- 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.
- LIMA, B. T.S. **Avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de *Theobroma speciosum* willd ex spreng (malvaceae)**. 2018. 54 p. Trabalho de conclusão de curso- Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Pará, 2018.
- MACHADO, A. S. R.; PÉREZ, E. L.; SOUZA, A. G. C.; LIMA, R. M. B. Plantas nativas da Amazônia usadas na agricultura familiar. In: 4ª Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, 2008, Manaus, **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 112-121, 2008.
- MAGENTA, M.A.G. 2015 *Tilesia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.
- MARÔCO, J. **Análise estatística com o SPSS Statistics**. Report Number, Lda, 2ª ed. p. 298, 2011.
- MERCYKUTTY, V. C; STEPHEN, J. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the *Allium* test. **Cytologia**, v. 45, n. 4, p. 769-777, 1980.
- MICHIE, J .; BEAVIS, P. A.; FREEMAN, A. J.; VERVOORT, S. J.; RAMSBOTTOM, K. M.; NARASIMHAN, V.; SILKE, J. Antagonism of IAPs enhances CAR T-cell efficacy. **Cancer Immunol. Res**, v. 7, p. 183-192, 2019.
- MIRANDA, J.A.L.; ROCHA, J.A.; ARAÚJO, K.M.; QUELEMES, P.V.; MAYO, S.J., ANDRADE, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, p.1142-1149, 2015.
- MOTA, G. A.; BRANDÃO, R. S.; MIRANDA, L. B.; MIRANDA, L. C. B.; JUNIOR, A. de F. G. Avaliação do potencial citotóxico de duas espécies botânicas do cerrado de uso medicinal por meio do sistema-teste *Allium cepa*. **Curso de Farmácia da Faculdade Montes Belos**, 2017.
- NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, v.504, p. 3-16, 2002.

NAU, S. R.; SEVEGNANI, L. Vegetação recolonizadora em mina de argila e propostas para recuperação ambiental. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto, MG, Anais... Ouro Preto: SOBRADE-SIF, p.54-66, 1997.

OLIVEIRA A.K.M.; PEREIRA K.C.L.; MULLER J.A.I.; MATIAS R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, Campo Grande-MS, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B.. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. **Toxicological sciences**, v. 119, n. 1, p. 3-19, 2010.

PANNACCI, E.; TEI, F. Effects of mechanical and chemical methods on weed control, weed seed rain and crop yield in maize, sunflower and soyabean. **Crop protection**, v. 64, p. 51-59, 2014.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in life science**, v. 9, n. 2, p.110-118, 2016.

PEQUENO, M. V.; OLIVEIRA, T. K.; MARQUES, J. DE. S. Estrutura e composição florística de um sistema agroflorestal com fins de reflorestamento. In: X congresso 52 Brasileiro de sistemas agroflorestais, Mato Grosso, **Anais...** Mato Grosso, Universidade Federal do Mato Grosso, 2016.

PETEROS, N. P.; UY, M. M. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four Philippine medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 5, p. 407-414, 2010.

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.

PORTIS, I. G.; FIGUEIREDO, F. R. G.; PENA, R. V.; HANUSCH, A. L.; SOUSA, L. P.; MACHADO, R. C.; SILVA, C. C.; CRUZ, A. D. Bioensaio Citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *Choclhospermum regium*. **Refacer**, v. 5, n. 1, 2016.

RIZVI, S. J. H.; HAQUE, H.; SINGH, V. K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: **Allelopathy**, Springer, Dordrecht, p. 1-10, 1992.

ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes**, v. 2. Academic Press, 2012.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; MAÑAS, F.; COMINI, L.; REINOSO, E.; ZANON, S. M. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

SANTOS, J. P., PEREIRA, G. F., PORTO, B. S. M., MACHADO, M. V. S., VIEIRA, T. C., & DE MORAIS, C. R. avaliação da capacidade genotóxica do extrato aquoso de Averrhoa carambola, por meio do teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Revista GeTeC**, v. 8, n.21, 2019.

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SILVA, B. T. S. **avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de theobroma speciosum willd ex spreng (Malvaceae)**. 2018. 54 p. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Pará, 2018.

SILVA, C. R. S.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian Theobroma L. collections species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Bot.** v. 18, n.2, p. 333-341, 2004.

SOUZA, C. T. **Avaliação do potencial alelopático de extratos de *Tilesia baccata* (l. f) pruski (asteraceae)**. 2018. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Pará, 2018.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Potencial alelopático de plantas de Acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.18, n.3, p.435-441, 2000.

STURBELLE, R. T., PINHO, D. S. D., RESTANI, R. G., OLIVEIRA, G. R. D., GARCIAS, G. D. L., & MARTINO-ROTH, M. D. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. bras. farmacogn**, v. 20, n.3, p. 409-415, 2010.

TAVARES, W.S. et al. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops Products**, v.31, p.384-388, 2009.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, IV. H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: **Environmental contamination**. IntechOpen, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Vol. 29, N. 2, p. 326-337, 2006.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WYNDER, E. L.; HALL, N. E. L.; POLANSKY, M. Epidemiology of coffee and pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 43, n. 8, p. 3900-3906, 1983.

YUET PING, K.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. (2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

ZHANG, Y. J.; NAGAO, T.; TANAKA, T.; YANG, C. R.; OKABE, H.; KOUNO, I.
Antiproliferative activity of the main constituents from *Phyllanthus emblica*. **Biological and
Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 2, p. 251-255, 2004.