

**DANIELE PAULA MALTEZO**



**DIVERSIDADE, ESTRUTURA GENÉTICA E  
CITOGENOTOXICIDADE DE *Copaifera langsdorffii*  
DESF. (FABACEAE) NATIVA DA AMAZÔNIA  
MATO-GROSSENSE**

**Dissertação de Mestrado**

**Alta Floresta, MT**

**2021**

	DANIELE PAULA MALTEZO	Diss. MESTRADO	PPGBioAgro 2021

	<p><b>UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO</b> <b>FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E</b> <b>AGRÁRIAS</b> <b>PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM</b> <b>BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS</b> <b>AMAZÔNICOS</b></p>	
---	--	---

**DANIELE PAULA MALTEZO**

**DIVERSIDADE, ESTRUTURA GENÉTICA E**  
**CITOGENOTOXICIDADE DE *Copaifera langsdorffii***  
**DESF. (FABACEAE) NATIVA DA AMAZÔNIA**  
**MATO-GROSSENSE**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi

Coorientadora: Dra. Julliane Dutra Medeiros

**Alta Floresta, MT**

**2021**

“AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.”

Catálogo na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Luiz Kenji Umeno Alencar CRB 1/2037

MALTEZO, Daniele Paula.

M261d Diversidade, Estrutura Genética e Citogenotoxicidade de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) Nativa da Amazônia Mato-Grossense / Daniele Paula Maltezo – Alta Floresta, 2021.  
74 f.; 30cm. (ilustrações) Il. Color. (sim)

Trabalho De Conclusão De Curso  
(Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação Stricto Sensu  
(Mestrado Acadêmico) Biodiversidade e Agroecossistemas  
Amazônicos, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Câmpus  
de Alta Floresta, Universidade Do Estado De Mato Grosso, 2021.

Orientadora: Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi  
Coorientadora: Dra. Julliane Dutra Medeiros

1. Amazônia. 2. Índice Mitótico. 3. Variabilidade Genética. I.  
Daniele Paula Maltezo. II. Diversidade, Estrutura Genética e  
Citogenotoxicidade *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) Nativa  
da Amazônia Mato-Grossense.


CDU 582.736.2

**DIVERSIDADE, ESTRUTURA GENÉTICA E  
CITOGENOTOXICIDADE DE *Copaifera langsdorffii*  
DESF. (FABACEAE) NATIVA DA AMAZÔNIA  
MATO-GROSSENSE**

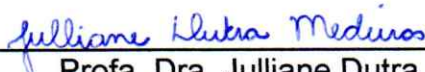
**DANIELE PAULA MALTEZO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

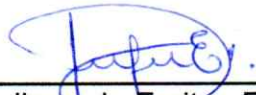
Aprovada: 20 de janeiro de 2021.



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi  
Orientadora – UNEMAT/PPGBioAgro



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros  
Coorientadora – UNEMAT



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Juliana de Freitas Encinas Dardengo  
UNEMAT



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita  
UNEMAT/PPGBioAgro



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo  
Ufes/CEUNES

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe, meu padrasto, meu irmão e ao meu esposo, por todo carinho, apoio e paciência, à minha orientadora e coorientadora, pelo carinho, confiança e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, sem ele não teria chegado até aqui.

À Universidade do Estado de Mato Grosso, e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos (PPGBioAgro) pela oportunidade, bem como a todos os profissionais que tornaram essa conquista possível.

À minha família, por tudo, especialmente a minha mãe e meu padrasto.

Ao meu esposo, por ter me acompanhado nas coletas, e permanecido ao meu lado o tempo todo.

À minha amiga Maria Ionaria, bem como seus familiares, por me acompanharem nas coletas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi, e coorientadora, Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros, pela confiança e dedicação.

Aos colegas da turma 2019/1 pelo companheirismo.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular pelo apoio no desenvolvimento das atividades laboratoriais.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Obrigada a todos pela paciência e dedicação para que eu pudesse concluir essa fase.

“É preciso diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, até que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.”

Paulo Freire



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS .....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	4
3. CAPÍTULOS .....	8
3.1 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GÊNÉTICA DE ENTRE INDIVÍDUOS DE DE <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. NA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, POR MEIO DE MARCADORES ISSR .....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	9
Introdução .....	10
Material e Métodos.....	12
Área de Estudo .....	12
Coleta do Material Vegetal.....	13
Extração e Quantificação de DNA.....	14
Reações e amplificação do DNA e eletroforese.....	15
Análise Estatística.....	16
Análise dos fragmentos amplificados.....	16
Diversidade Genética e Estrutura populacional .....	16
Resultados e Discussão.....	18
Polimorfismo genético de <i>Copaifera langsdorffii</i> por meio de marcadores ISSR .....	18
Diversidade e estrutura genética de <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	20
Conclusões .....	27
Referências Bibliográficas.....	28
3.2 POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	33
Resumo.....	34
Abstract.....	34
Introdução .....	35
Material e métodos.....	37
Extratos aquosos .....	37
Teste <i>Allium cepa</i> L.....	37
Avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico.....	38
Fixação e preparo de lâminas.....	38
Determinação do índice mitótico.....	39
Análises estatísticas.....	39
Resultados e Discussão.....	41
Efeito tóxico dos extratos aquosos de <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	41
Efeito Citotóxico dos extratos aquosos de <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	44
Efeito Genotóxico dos extratos aquosos de <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	48
Conclusões .....	51
Referências Bibliográficas.....	52
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) dos primers ISSR utilizados na caracterização molecular dos 27 indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	15
2. Número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (% P) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos primers utilizados na caracterização molecular de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	19
3. Matriz de dissimilaridade genética entre 27 indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. calculada com base no complemento do coeficiente de Jaccard, utilizando 106 fragmentos ISSR. ....	21
4. Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), estresse e distorção dos métodos Ward, Vizinho mais Próximo (SL) e UPGMA para a inferência do agrupamento hierárquico.....	22
5. Diversidade genética intrapopulacional de <i>Copaifera langsdorffii</i> dos grupos A e B obtidos na análise bayesiana.....	25
6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) dos dois grupos (k=2), determinados pela análise bayesiana para os 27 indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> , com uso de 12 primers ISSR. ....	26
<b>CAPÍTULO 2</b>	
1. Crescimento do sistema radicular dos bulbos de <i>Allium cepa</i> exposto aos extratos tipo infuso e decocto da casca do caule e das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	43
2. Análise de Variância (ANOVA) para o índice mitótico das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a extratos aquosos (infuso e decocto) da casca do caule de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	44
3. Número de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes etapas do ciclo celular, submetidas a diferentes concentrações e extratos da casca do caule e folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> , bem como aos controles: negativos (CN) e positivos (CP). ....	46
4. Análise de Variância (ANOVA) para o Índice mitótico das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostos a extratos aquosos (infuso e decocto) das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	47
5. Partes da planta, extrato, concentrações, número de células observadas, número de células em divisão, número de aberrações celulares e frequência de aberrações celulares dos extratos da casca do caule e das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> sobre as células meristemáticas das radículas de <i>Allium cepa</i> . ....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. Localização dos indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> , coletados no município de Alta Floresta, MT. As subunidades estão evidenciadas (I, II, III e IV). ....	12
2. Localização dos indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> na área amostrada. As subunidades estão evidenciadas (I, II, III e IV).....	13
3. Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total de 15 amostras de <i>Copaifera langsdorffii</i> . M: DNA ladder de 10 ng $\mu$ L <sup>-1</sup> .....	18
4. Fotodocumentação de DNA amplificado com o primer UBC-816 dos indivíduos AF1 ao AF15 de <i>Copaifera langsdorffii</i> . M: Marcador Molecular de 100pb. ....	18
5. Distribuição da dissimilaridade genética entre os pares de indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	22
6. Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 27 indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf., obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade. As marcações em verde e vermelho correspondem aos grupos gerados pelo Structure (Ver figura 7). *indivíduos mais diferentes dos demais dentro do grupo A no Structure. ....	23
7. Agrupamento obtido por meio da análise bayesiana dos 27 indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. Os indivíduos estão representados por barras verticais com coloração de acordo com o grupo ao qual pertencem (dois grupos, K= 2). *Indivíduos mais diferentes dentro do grupo A. ....	24
<b>CAPÍTULO 2</b>	
1. Crescimento do sistema radicular (CSR) dos bulbos de <i>Allium cepa</i> expostos aos extratos aquosos do tipo infuso e decocto (A e B, respectivamente) da casca do caule de <i>Copaifera langsdorffii</i> . A linha tracejada representa a média do CSR do controle positivo. ....	41
2. Crescimento do sistema radicular (CSR) dos bulbos de <i>Allium cepa</i> expostas aos extratos aquosos do tipo infuso (A) e decocto (B) das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . A linha tracejada representa a média do CSR do controle positivo. ....	42
3. Índice mitótico (IM) das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas aos extratos aquosos tipo infuso e decocto obtidos da casca do caule de <i>Copaifera langsdorffii</i> . ....	45
4. Índice mitótico das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas aos extratos aquosos do tipo infuso (A) e decocto (B) das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . A linha tracejada representa a média do IM do controle positivo. .	48
5. Fases do ciclo celular observadas em células do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> em diferentes concentrações de extratos aquosos de <i>Copaifera langsdorffii</i> . Anáfase e telófase (A), Prófase, telófase e metáfase (B), Anáfase com ruptura cromossômica (C), Anáfase com ponte (D), Telófase com ponte (E), Metáfase e metáfase irregular (F), Anáfase com ruptura cromossômica (G) e Metáfase poliploide (H). P = prófase; M = metáfase; M.I. = metáfase irregular; M.P. = metáfase poliploide; A = anáfase; A.P. = anáfase com ponte; A.R.C. = anáfase	

com ruptura cromossômica; T = telófase e T.P. = telófase com ponte; Barra = 10  
µm. .... 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C** temperatura em graus Celsius

**µL** microlitro

**g** grama

**h** hora

**mg** miligrama

**mL** mililitros

**mm** milímetro

**m/v** massa por volume

**ng** nanograma

**nm** nanômetro

**rpm** rotações por minuto

**V** volts

**v/v** volume/volume

## LISTA DE SIGLAS

- ACM** Anomalias no Ciclo Mitótico
- AMOVA** Análise de Variância Molecular
- ANOVA** Análise de Variância
- B.O.D** *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda de Oxigênio Bioquímico)
- CEPTAM** Centro de Pesquisa e de Tecnologia da Amazônia Meridional
- CV** Coeficiente de Variação
- DIC** Delineamento Inteiramente Casualizado
- EMBRAPA** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- GPS** *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamento Global)
- HCl** Ácido Clorídrico
- IPCS** *International Programme on Chemical Safety* (Programa Internacional de Segurança Química)
- ISSR** *Inter Simple Sequence Repeats* (Repetições Entre Sequências Simples)
- MgCl<sub>2</sub>** Cloreto de Magnésio
- OMS** Organização Mundial de Saúde
- PCR** *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PPGBioAgro** Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos
- R<sup>2</sup>** Coeficiente de Determinação
- UNEMAT** Universidade do Estado de Mato Grosso
- UNEP** *United Nations Environment Programme* (Programa das Nações Unidas para o Ambiente)
- UPGMA** *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (Método de Agrupamentos não Ponderados usando Médias Aritméticas)
- CCC** Coeficiente de Correlação Cofenética
- CSR** Crescimento do Sistema Radicular
- CTAB** *Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide* (Brometo de hexadeciltrimetil amônio catiônico)
- DNA** *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- EAD** Extrato Aquoso Decocto
- EAI** Extrato Aquoso Infuso

**EDTA** *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiaminotetracético)

**IM** Índice Mitótico

**PIC** *Polymorphic Information Content* (Conteúdo de Informação Polimórfica)

## RESUMO

MALTEZO, Daniele Paula. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, janeiro de 2021. **Diversidade, estrutura genética e citogenotoxicidade de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) nativa da Amazônia Mato-Grossense.** Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi, Coorientadora: Julliane Dutra Medeiros.

Estima-se que cerca de 20% de toda a biodiversidade do planeta encontra-se na Amazônia. A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, e 60% de sua extensão pertence ao território brasileiro. Dentre as espécies presentes na Amazônia destaca-se a *Copaifera langsdorffii* Desf., explorada principalmente para extração de óleo-resina e madeira, também é utilizada na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades. O manejo florestal inadequado de *C. langsdorffii*, bem como a fragmentação florestal podem provocar a diminuição do número de indivíduos nas populações, o que em longo prazo pode ocasionar a perda da variabilidade genética. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular de 27 indivíduos de *C. langsdorffii* coletados na Amazônia Mato-Grossense, e avaliar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico da espécie. Para avaliação da diversidade e estrutura genética foram coletadas folhas de 27 indivíduos adultos de *C. langsdorffii*, das quais extraiu-se o DNA. Para amplificação do DNA extraído das folhas dos indivíduos amostrados foram utilizados 12 primers ISSR, que amplificaram 106 fragmentos, sendo 98,11% polimórficos. O conteúdo de Informação polimórfica (PIC) de cada *primer* variou entre 0,45 e 0,81. A média de dissimilaridade encontrada foi de 0,49, indicando uma alta diversidade genética entre muitos pares de indivíduos. A maior variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos obtidos e não entre eles. A avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico foi realizada por meio do teste *Allium cepa*. Foram avaliados os extratos aquosos (infuso e decocto) obtidos da casca do caule e das folhas de *C. langsdorffii*, com cinco concentrações distintas e dois controles, sendo a água destilada (controle negativo) e o glifosato a 1% (controle positivo). Foram avaliados o crescimento do sistema radicular (CSR), o índice mitótico (IM), e a frequência de alterações cromossômicas e/ou anormalidades nas fases da divisão celular. As maiores reduções do CSR foram encontradas nos extratos decoctos (casca do caule e



folhas). Para a casca do caule, ambos os extratos na concentração 0,032 mg mL<sup>-1</sup> apresentaram menor IM. As concentrações 0,002 mg mL<sup>-1</sup> do extrato infuso da casca, e 0,004 mg mL<sup>-1</sup> do extrato decocto das folhas, apresentaram respectivamente 4,19 e 3,55 % de aberrações celulares. Em conclusão, o percentual de polimorfismo, valores de dissimilaridade genética e índices de diversidade genética, apontam que há alta variabilidade genética entre os indivíduos de *Copaifera langsdorffii*. Estes dados sugerem que os *primers* ISSR são eficientes na detecção de polimorfismo nesta espécie, e que os indivíduos apresentam potencial para compor programas que visem a preservação da espécie e capacidade de integrar bancos de germoplasma. Além disso, este estudo evidenciou o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico dos extratos aquosos sobre o organismo teste.

Palavras-chave: Amazônia, Índice mitótico, Variabilidade genética.

## ABSTRACT

MALTEZO, Daniele Paula. M.Sc. State University of Mato Grosso, January 2021. **Diversity, genetic structure and Cytogenotoxicity of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) native to northern Mato Grosso.** Advisor: Ana Aparecida Bandini Rossi. Co-supervisor: Julliane Dutra Medeiros.

The Amazon Forest is the largest tropical forest in the world and it is estimated that 20% of all planet's biodiversity is found in the Amazon. From the 60% that extension belongs to Brazilian territory. Among the species observed in the Amazon stand out *Copaifera langsdorffii* Desf., that is explored mainly for the extraction of oil-resin and wood, also used by folk medicine for the treatment of many diseases. The inadequate forest management of *C. langsdorffii*, as well as forest fragmentation, can cause a decrease in the number of individuals from populations, which in a long term can cause the loss of genetic variability. This study aimed to perform the molecular characterization of 27 individuals of *C. langsdorffii* collected in the Mato-Grosso Amazon, and also to evaluate the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of the species. In order to evaluate the genetic diversity and structure, we used 12 ISSR primers that amplified 106 fragments, in which 98.11% were polymorphic. The content of polymorphic information (PIC) of each primer varied between 0.45 and 0.81. The average dissimilarity between pairs of individuals was 0.49, indicating a high genetic diversity. The greatest genetic variability was found within the groups of individuals and not between them. The assessment of toxic, cytotoxic and genotoxic potential of *C. langsdorffii* was performed using the *Allium cepa* test. The aqueous extracts (infused and decocted) obtained from the stem bark and leaves were evaluated. We used five different concentrations and two controls, the negative one with distilled water and the positive control with glyphosate at 1%. It was evaluated the growth of the root system (CSR), the mitotic index (MI), and the frequency of chromosomal changes and abnormalities on cell cycle phases. The greatest reductions in CSR were found in decocted extracts (stem bark and leaves). For the stem bark, both extracts at a concentration of 0.032 mg mL<sup>-1</sup> showed lower MI. The concentrations of 0.002 mg mL<sup>-1</sup> of infused bark extract and 0.004 mg mL<sup>-1</sup> from decocted leaves extract showed 4.19 and 3.55% of cell aberrations, respectively. In conclusion, the percentage of polymorphism, values of genetic dissimilarity

and indexes of genetic diversity, indicated high genetic variability among *Copaifera langsdorffii* individuals. These findings suggest that ISSR primers are efficient in detecting polymorphism for *C. langsdorffii*, and the individuals has the potential to compose programs for preserving the species and the ability to integrate germplasm banks. In addition, this study showed the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of aqueous extracts on the tested organism.

Keywords: Amazon, Genetic variability, Mitotic index.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta Amazônica abriga cerca de 20% de toda a biodiversidade do planeta (SILVA, 2018). Com aproximadamente 6,7 milhões de km<sup>2</sup> é considerada a maior floresta tropical do mundo, e 60% de sua extensão está em território brasileiro (FERREIRA *et al.*, 2010), distribuídos nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (EMBRAPA, 2021).

Dentre as espécies presentes na Amazônia destaca-se a *Copaifera langsdorffii* Desf., amplamente distribuída no Brasil (LORENZI, 1992; REIS *et al.*, 2016). Utilizada na medicina popular para o tratamento de pelo menos 55 doenças (RIBEIRO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016), dentre as quais podemos citar asma, amigdalite, eczemas (MESSIAS *et al.*, 2015), ou ainda como antisséptico, cicatrizante, expectorante e diurético (BRAGA *et al.*, 2019).

A *C. langsdorffii* apresenta reprodução mista, com predominância de alogamia (FREITAS; OLIVEIRA, 2002), sendo as abelhas suas principais polinizadoras (SHANLEY; MEDINA, 2005), destacando-se a *Trigona* sp. e *Apis mellifera* (CRESTANA; KAGEYAMA, 1989; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O período de floração e frutificação ocorre aproximadamente a partir dos cinco anos (LISBOA *et al.*, 2018), com florescimento na estação chuvosa, entre janeiro e abril (ALENCAR; ALMEIDA; FERNANDES, 1979; RIGMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2004).

A frutificação é supra-anual, marcada por flutuação na produção (NEWSTROM; FRANKIE; BAKER, 1994; PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002; PEREIRA; SANTANA; RANAL, 2009), ocorrendo entre os meses de maio a setembro (SHANLEY; MEDINA, 2005). A dispersão dos frutos pode ocorrer por meio de animais, como aves e macacos, ou de forma hidrocórica (ROSSI, 2009). A árvore apresenta deciduidade marcante no período de julho a agosto, e o brotamento das folhas ocorre nos meses de setembro a outubro, sendo facilmente observado pelo aspecto avermelhado da copa (SILVA, 2009).

Segundo Martins-da-Silva, Pereira e Lima (2008) a *C. langsdorffii* encontra-se entre as principais espécies conhecidas e utilizadas para extração do óleo, juntamente com a *C. reticulata* e *C. officinalis*. Além do óleo, também é utilizada sua madeira nas construções civil e naval (CARVALHO, 1994) e na

produção de compensados (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008). Por meio de suas flores, mel de altíssima qualidade é produzido e suas mudas são utilizadas em reflorestamentos (CARVALHO, 1994).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) nos países em desenvolvimento cerca de 85% da população utiliza plantas medicinais para os cuidados básicos com a saúde (BRASIL, 2006). Algumas substâncias que compõem as plantas medicinais podem desencadear efeitos deletérios que podem chegar a serem fatais (PINHO *et al.*, 2010). Assim, torna-se extremamente importante conhecer os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos a fim de avaliar o seu potencial nocivo ao organismo humano (FREITAS *et al.*, 2014).

O teste *Allium cepa* permite avaliar os efeitos tóxicos e citotóxicos de extratos aquosos vegetais, por meio da redução do crescimento das raízes e da diminuição do índice mitótico respectivamente (ALMEIDA, 2019), bem como os efeitos genotóxicos, por meio da análise da presença de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÖ; LEVAN, 1994). Essa metodologia já foi validada por muitos pesquisadores que a realizaram em conjunto com experimentos *in vivo* usando animais como modelos e obtiveram resultados semelhantes (BAGATTINI; SILVA; TEDESCO, 2007). A eficiência do sistema *A. cepa* se deve às suas características cinéticas de proliferação, além de apresentar baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular (BELCAVELLO *et al.*, 2012).

A exploração inadequada de *C. langsdorffii* com técnicas invasivas e repetitivas para extração do óleo (RIGMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2004) também colocam em risco a diversidade genética da espécie, considerada um dos três níveis da biodiversidade, já que é necessária para que as populações evoluam em resposta a mudanças ambientais e os níveis de heterozigosidade na população reduzem a endogamia (REED; FRANKHAN, 2003).

A perda de variabilidade genética pode ocorrer pelo aumento da taxa de endogamia, por deriva genética e flutuações demográficas, que contribuem para redução da população até possível extinção (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). E variabilidade genética intraespecífica é fundamental para a persistência

das espécies na natureza, portanto conhecer a variação genética e como ela é distribuída geograficamente em cada espécie são fundamentais para caracterizar seu status de conservação (SANTOS *et al.*, 2010). Estudos sobre a caracterização molecular permitem reconhecer a perda genética real, contribuindo para a tomada de decisões quanto as estratégias de conservação e gestão sustentável de recursos genéticos (LIMA *et al.*, 2015; DUARTE; NOGUEIRA; VIEIRA, 2018).

Dentre as ferramentas utilizadas para estudos de diversidade genética, temos os marcadores moleculares, por meio dos quais é possível verificar a variabilidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas (SOUZA *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares, que avaliam a sequência de DNA do organismo permitem uma maior detecção de polimorfismos se comparados com marcadores morfológicos, que não apresentam neutralidade fenotípica (EMBRAPA, 2000). Dentre eles, destacam-se os ISSRs (*Inter-simple sequence repeats*), que pertencem à categoria dos marcadores baseados em PCR, e ao contrário dos demais, não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo e apresentam boa transferibilidade (DIAS *et al.*, 2015).

A técnica ISSR envolve amplificação de um segmento de DNA presente a uma distância amplificável entre duas regiões idênticas de repetição de microssatélites orientadas na direção oposta (REDDY *et al.*, 2002); esse método apresenta como principal vantagem a facilidade nas análises e o baixo custo (TURCHETTO *et al.*, 2017). Como os demais marcadores dominantes, não fazem distinção entre homozigotos dominantes e heterozigotos, sendo que os polimorfismos entre os indivíduos são identificados nas análises eletroforéticas pela presença ou ausência de bandas (SOUZA *et al.*, 2017).

Neste contexto, objetivamos verificar a estrutura e a diversidade genética entre indivíduos de *Copaifera langsdorffii* nativa da Amazônia mato-grossense por meio de marcadores ISSR, bem como avaliar a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da espécie por meio do teste *Allium cepa*.

## 2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J. da C.; ALMEIDA, R.A.; FERNANDES, N.P. Fenologia de espécies florestais em floresta tropical úmida de terra firme na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 9, n. 1, p. 163-198. 1979.

ALMEIDA, L.F.R. de *et al.* Sesquiterpenos não oxigenados no óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Desf. durante o dia na estação seca. **PLoS One**, v. 11, n. 2, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149332>.

ALMEIDA, F.K.V. de *et al.* Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lecheri*). **Revista Fitos**, v. 13, n. 1, p. 29-37, 2019. DOI: 10.17648/2446-4775.2019.605.

BAGATTINI, 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>

BELCAVELLO, L. *et al* 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.

BRAGA, A.M.S *et al.* Fenologia de três espécies arbóreas em um trecho de vegetação subcaducifólia no norte de Piauí, Brasil. **Biotemas**, v. 32, n. 2, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n2p33>

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 148p, 2006. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras; recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Curitiba: EMRAPA/CNPF: Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640p. Disponível em: [https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index\\_especies.htm](https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index_especies.htm). Acesso em: 20 de junho de 2020.

CRESTANA, C. S. M.; KAGEYAMA, P. Y.; Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae), o “óleo de copaíba”. **Revista do Instituto Florestal**, v. 1, p. 201-214, 1989.

DIAS, F.T.C. *et al.* Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 563-572, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150039>

DUARTE, M.M; NOGUEIRA, A.C.; VIEIRA, E.S.N. Diversidade e estrutura genética espacial em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart. **Revista**

**Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, 2018. DOI:10.5039/agraria.v13i4a5573

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Marcadores moleculares: DNA. 2000. Disponível em: [www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03\\_4.htm#:~:text=O uso de marcadores moleculares,de um programa de melhoramento](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03_4.htm#:~:text=O uso de marcadores moleculares,de um programa de melhoramento). Acesso em 25 de janeiro de 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Contando ciências. Disponível em: <https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-amazonia>. Acesso em 25 de janeiro de 2021

FERREIRA, M. *et al.* **Arpa: Biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente. 32p, 2010. Disponível em: <http://arpa.mma.gov.br/wp-content/uploads/2012/10/arpaBiodiversidade.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2020.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the First ten MEIC Chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v. 21, p.139-149, 1994.

FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 311-321, 2002.

FREITAS, J. V. *et al.* Prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 4, 2014. Disponível em: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/83>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

LIMA, R.A. *et al.* Diversidade e estrutura genética de *Senna reticulata*. **Revista Floresta**, v. 45, n. 3, p. 507-514, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v45i3.38079>.

LISBOA, A.J.M. *et al.* Análises fotoquímicas de *Copaifera langsdorffii* DESF. **Revista Científica Sena Aires**, v.7, n.3, p.208-213, 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352p., 1992.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F; LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008.

MESSIAS, M.C.T.B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_139](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_139)



NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, v.26, n.2, p.141-159, 1994.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.183-194, 2002.

PEREIRA, R. S.; SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Emergência de plântulas oriundas de sementes recém colhidas e armazenadas de *Copaifera langsdorffii* desf. (caesalpinioideae), Triângulo Mineiro, Brasil. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 643-652, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000400007>

PINHO, D. S. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200005>

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Universidade Estadual de Londrina. Ed. 1ª Edição, 2001.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>

REED, D. H.; FRANKHAM, R. **Correlation between Fitness and Genetic Diversity**. *University of Mississippi, Conservation Biology*, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.

REIS, S.M. *et al.* Desenvolvimento inicial e qualidade de mudas de *Copaifera langsdorffii* Desf. sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 11-20, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509821061>

RIGMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O. **Copaíba: Ecologia e Produção de Óleo-Resina**. EMBRAPA, outubro, 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/501674/copaiba-ecologia-e-producao-de-oleo-resina>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

RIBEIRO, D.A. *et al.* Plantas medicinais promissoras para bioprospecção em área de cerrado da Chapara do Araripe, Nordeste do Brasil. **Revista de Etnofarmacologia**, v. 155, n. 3, p. 1522- 1533, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042>

ROSSI, T. ***Copaifera langsdorffii* (Copaiba)**. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais-IPEF, 2009.

SANTOS, F. R. *et al.* Diversidade Genética. **Biota Minas**, p. 389-410, 2010. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/pdf/santos09biotaminas-divgen.pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

SOUZA, S. A. M. *et al.* Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050101>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

SOUZA, S.S. *et al.* Seleção de iniciadores ISSR para estudos de diversidade genética em de *Passiflora cincinnata* Mast. In: XIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 12, 2017. Petrolina. **Anais...** Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2017, p.299-303. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

TURCHETTO, C. *et al.* **Marcadores genéticos baseados em DNA. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 12-20, 2017. Disponível em: [https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>

SHANLEY, P; MEDINA, G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Belém: CIFOR, IMAZON, 2005.

SILVA, J. O. Esclerofilia, taninos e insetos herbívoros associados a *Copaifera lagsdorffii* Desf. (Fabaceae: Caesalpinioideae) em área de transição Cerrado-Caatinga no Brasil. **Ecologia Austral**, v. 19, p. 197-206, 2009.

SILVA, R.B.C. Importância da biodiversidade. In: MARTINS, M.B.; JARDIM, M.A.G. **Reflexões em biologia da conservação**. 1ª edição. Museu Paraense Emilio Goeldi, v.1, p.19-25, 2018.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS DE *Copaifera langsdorffii* Desf. DA AMAZÔNIA MATO-GROSSENSE, POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

**Resumo** – (Diversidade e estrutura genética entre indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf. da Amazônia Mato-Grossense, por meio de marcadores ISSR). A Amazônia é o maior bioma do mundo e abriga cerca de 40 mil espécies de plantas, dentre elas a *Copaifera langsdorffii*, explorada principalmente para extração de óleo-resina e madeira, muitas vezes de forma incorreta, o que pode ocasionar a perda de variabilidade genética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética entre indivíduos de *C. langsdorffii* localizada na Amazônia Mato-Grossense, por meio de marcadores ISSR. Foram amostrados 27 indivíduos, cujo DNA foi amplificado com 12 *primers* ISSR. A análise bayesiana, AMOVA e UPGMA foram utilizados para inferir as relações e diversidade genéticas, bem como a estrutura populacional; para caracterização da variabilidade genética foi utilizado o programa POPGENE. Foram amplificados 106 fragmentos, sendo 98,11% polimórficos. O conteúdo de Informação polimórfica (PIC) de cada *primer* variou entre 0,45 e 0,81. A média de dissimilaridade encontrada foi de 0,49, indicando uma alta diversidade genética entre muitos pares de indivíduos. A maior variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos e não entre eles. O percentual de polimorfismo, valores de dissimilaridade genética e índices de diversidade genética apontam que há alta variabilidade genética entre os indivíduos de *Copaifera langsdorffii*, sugerindo que os *primers* ISSR se mostraram eficientes na detecção de polimorfismo nesta espécie e que os indivíduos apresentam potencial para compor programas que visem a preservação da espécie e capacidade de integrar bancos de germoplasma.

Palavras-chaves: Copaiba, ISSR, Variabilidade genética.

**Abstract** – (Genetic diversity and structure among individuals of *Copaifera langsdorffii* Desf. the Mato-Grossense Amazon, using ISSR markers). The Amazon is the largest biome in the world and harbor around 40,000 species of plants, including *Copaifera langsdorffii*. This species is explored mainly for the extraction of its oil-resin and wood, often being made incorrectly, which can cause loss of genetic variability. The aim of this work was to evaluate the diversity and genetic structure among individuals of *C. langsdorffii* located the Mato-Grossense, using ISSR markers. We sampled 27 individuals whose DNA was amplified with 12 ISSR primers. The Bayesian analysis, AMOVA and UPGMA were used to infer genetics relationships and diversity, as well population structure. The POPGENE program was used to characterize the genetic variability. The primers amplified 106 fragments, in which 98.11% were polymorphic. The content of polymorphic information (PIC) from each primer varied 0.45 and 0.81. The average dissimilarity found was 0.49, indicating a high genetic diversity among many pairs of individuals. The greatest genetic variability was found within the groups of individuals and not between them. The percentage of polymorphism, values of genetic dissimilarity and indexes of genetic diversity, indicate that there is high genetic variability among *Copaifera langsdorffii* individuals. These results suggest that ISSR primers are efficient in detecting polymorphism in this species, and that the population has the potential to compose programs for preserving the species and the ability to integrate germplasm banks.

Keywords: Copaiba, ISSR, Genetic variability.

## Introdução

A Amazônia é o maior bioma do mundo e abriga cerca de 300 espécies de mamíferos, 1,3 mil espécies de aves e 40 mil espécies de plantas (ICMBIO, 2020), das quais destacamos o gênero *Copaifera* L., representado por 26 espécies e nove (09) variedades encontradas em quase todas as regiões do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). As árvores são conhecidas no Brasil como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva e copai (CASCON, 2004; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). A exploração da *Copaifera langsdorffii* Desf. ocorre de duas maneiras principais, pela extração do óleo resina e da madeira.

Diversos métodos são utilizados para extração do óleo resina da copaíba, em sua maioria causam prejuízos à planta, ocasionando por vezes sua morte (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O uso de sua madeira nas construções civil e naval (CARVALHO, 1994) e na produção de compensados (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008) também é significativo.

O manejo inadequado da *C. langsdorffii*, bem como a fragmentação florestal, influenciam na composição genética das populações. Também provocam a diminuição do número de indivíduos, o que em longo prazo pode acarretar aumento da endogamia, redução da variabilidade genética e consequentemente a perda da capacidade adaptativa da espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A variabilidade genética intraespecífica é fundamental para a persistência das espécies na natureza, portanto saber o quanto existe de variação genética e como ela é distribuída geograficamente em cada espécie é necessário para caracterizar seu status de conservação (SANTOS *et al.*, 2010). Dessa forma muitos estudos tem utilizado como ferramenta marcadores genéticos para conhecer a variabilidade e a distribuição genética de espécies.

Segundo Turchetto *et al.* (2017) um marcador genético é qualquer caráter visível ou um fenótipo que de alguma forma seja analisável, para o qual os alelos em *loci* individuais segregam de uma maneira mendeliana. Os marcadores moleculares de DNA são ferramentas eficazes para revelar a presença de polimorfismo genético (HIGA; SILVA, 2006; RODRIGUES; BRANCALION; ISERNHAGEN, 2009; SOUZA; SOUZA; PEREIRA, 2018), apresentando sucesso em estudos de genética de populações vegetais (BORÉM; CAIXETA, 2016; CORDEIRO *et al.*, 2020). Entre eles, destacam-se os

baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), que podem ser aplicados a espécies não modelo e, podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominante e codominante (TURCHETTO *et al.*, 2017), sendo que os marcadores dominantes, não fazem distinção entre homozigotos dominantes e heterozigotos (ZIETJIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; COSTA *et al.*, 2015).

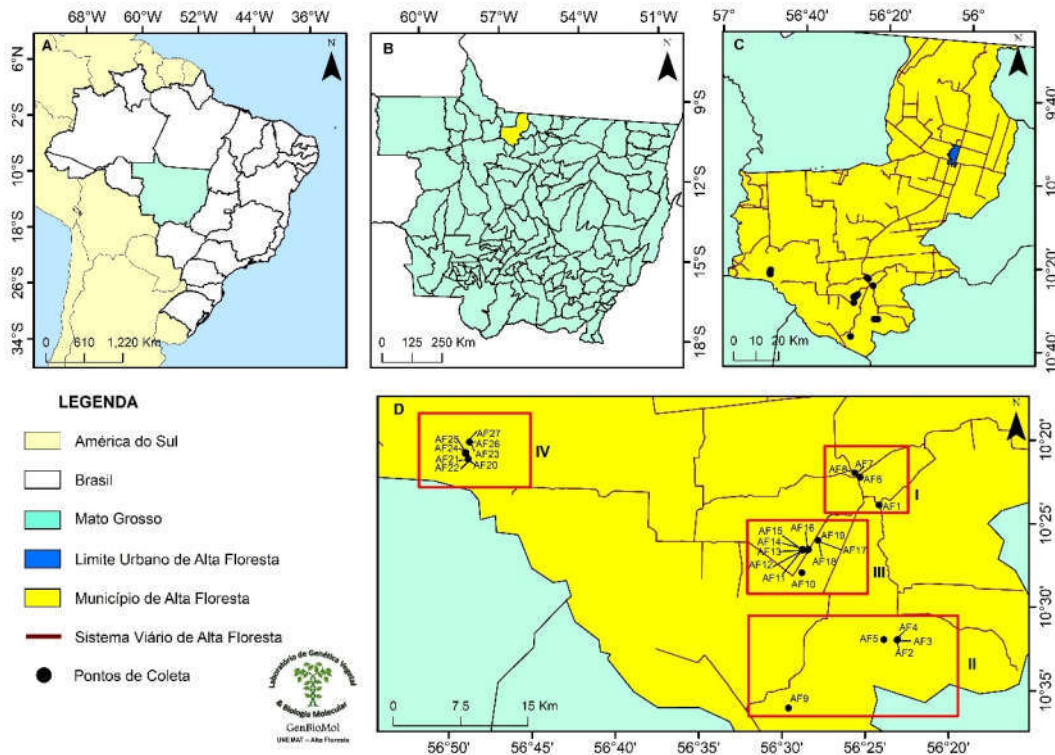
Dentro dos marcadores dominantes baseados em PCR temos os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), amplamente utilizados em estudos referentes à caracterização genética, devido ao baixo custo e alta reprodutibilidade (NG; TAN, 2015). Os polimorfismos entre os indivíduos são identificados nas análises eletroforéticas pela presença ou ausência de bandas.

Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar a diversidade e estrutura genética entre indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf. da Amazônia Matogrossense, por meio de marcadores ISSR.

## Material e Métodos

### Área de Estudo

O estudo foi realizado a partir de amostras coletadas na localidade conhecida como Pista do Cabeça (Comunidade Novo Cruzeiro), a cerca de 75km da zona urbana do município de Alta Floresta, localizado no norte do Estado de Mato Grosso (Figura 1), cujo clima segundo Alvares *et al.* (2013) é classificado como do tipo Am (tropical úmido ou subúmido), com temperatura média superior à 24°C e precipitação de 2800 a 3100 mm.



**Figura 1.** Localização dos indivíduos de *Copaifera langsdorffii*, coletados no município de Alta Floresta, MT. As subunidades estão evidenciadas (I, II, III e IV).

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, do CEPTAM (Centro de Pesquisa e de Tecnologia da Amazônia Meridional), da Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Campus Universitário de Alta Floresta, Alta Floresta, MT.

Os pontos de coleta foram georreferenciados com o auxílio de um GPS (*Global System Position*). Os indivíduos amostrados formaram quatro subunidades amostrais [I (AF1, AF6, AF7 E AF8), II (AF2, AF3, AF4, AF5 e AF9),

III (AF10, AF11, AF12, AF13, AF14, AF15, AF16, AF17, AF18 e AF19) e IV (AF20, AF21, AF22, AF23, AF24, AF25, AF26 e AF27)], destacados na Figura 1D.

A subunidade amostral IV encontra-se mais distante das demais, sendo 36km da III, 41km da I e 44km da II. As subunidades mais próximas entre si são a I e a III (7km). Vale destacar que o indivíduo AF9 pertencente à subunidade II encontra-se afastado dos demais indivíduos dentro dessa subunidade (aproximadamente 12Km). Entre as subunidades amostrais há grandes áreas de pastagens, no entanto, as subunidades III e IV apresentam uma ligação por uma extensa área de mata nativa, como pode ser observado na figura 2.



**Figura 2.** Localização dos indivíduos de *Copaifera langsdorffii* na área amostrada. As subunidades amostrais estão evidenciadas (I, II, III e IV).

### Coleta do Material Vegetal

Foram coletadas duas folhas previamente selecionadas de cada um dos 27 indivíduos de *C. langsdorffii*. O material foliar coletado foi armazenado em sílica gel, e transportado para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus da UNEMAT de Alta Floresta. O material vegetal foi lavado em água corrente, seco com o auxílio de um papel toalha e armazenado a -20 °C.



## Extração e Quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 300 mg de folhas de cada amostra, seguindo o protocolo de CTAB (*Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Doyle e Doyle (1987): as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo, transferidas para microtubos de 2 mL, onde foi acrescentado 800  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB [CTAB 5%, polivinilpirrolidona (PVP) a 2% e  $\beta$ mercaptoetanol a 2%]. As amostras foram agitadas no vórtex (Kasvi, Brasil) e incubadas a 65°C por 30 min (agitadas manualmente a cada 10 min para homogeneizar) e centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo de 2 mL, adicionado 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitado novamente no vórtex por 30 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm, e a fase aquosa (superior) transferida para um microtubo de 1,5 mL, onde foi acrescentado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. Em seguida foram incubadas a -20 °C por 3 horas. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* lavado por duas vezes com etanol 70%, e uma vez com etanol 95%. A cada lavagem o material foi centrifugado por 3 min a 10.000 rpm. O *pellet* foi mantido em temperatura ambiente e posteriormente adicionado 40  $\mu\text{L}$  de TE (RNase 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e TE 0,1M) em cada amostra, levado a banho-maria por 30 min a 35°C. Após isso, as amostras foram ressuspensas e mantidas a -4 °C por 24 horas.

A avaliação da qualidade do DNA extraído bem como a quantificação foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/V) corado com brometo de etídio (0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), por 20 minutos. Para a quantificação, foi feita a comparação em eletroforese com um DNA de massa molecular pré-determinado de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os géis foram analisados em transluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras do DNA extraído foram diluídas em água destilada autoclavada e padronizadas a uma concentração de aproximadamente 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

## Reações e amplificação do DNA e eletroforese

Foram realizados testes de ampliações com um conjunto de 59 *primers* ISSR (*Inter Sequence Simple Repeats*), desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC) em 4 indivíduos. Após os testes, foram selecionados 12 *primers* (Tabela 1), que apresentaram mais polimorfismos e número de bandas, para caracterização molecular de todos os indivíduos.

**Tabela 1.** Identificação, sequência e temperatura de anelamento (TA) dos primers ISSR utilizados na caracterização molecular dos 27 indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf.

<i>Primer</i>	Sequência	TA (°C)
UBC – 808 DiAG3'C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52
UBC – 810 DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52
UBC – 816 DiCA3'T	CACACACACACACACAT	52
UBC – 817 DiCA3'A	CACACACACACACACAA	52
UBC – 818 DiCA3'G	CACACACACACACACAG	52
UBC – 825 DiAC3'T	ACACACACACACACACT	52
UBC – 828 DiTG3'A	TGTGTGTGTGTGTGTGA	56
UBC – 829 DiTG3'C	TGTGTGTGTGTGTGTGC	56
UBC – 834 DiAG3'YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT*	52
UBC – 873 (GACA) <sub>4</sub>	GACAGACAGACAGACA	56
DiCA5'CR	CRCACACACACACACACA*	62
DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA*	62

\*Y = (C ou T) e R = (A ou G). UBC - University of British Columbia.

As reações de amplificação via PCR foram realizadas em um volume total de 15 µL, sendo 20ng de DNA, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM *primer*, 0,2mM de cada dNTP, 2% de DMSO, 0,5U de Taq polimerase e tampão IB10X. Os ciclos de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 94 °C por 1,5 minutos; seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, temperatura de anelamento específica de cada iniciador (Tabela 1) por 45 segundos, 72 °C por 1,5 minutos e terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C, em termociclador MJ 96 (Biocycler, EUA).

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (89,15 mM de Tris Base, 88,95 mM de Ácido Bórico e 2,23 mM EDTA), em voltagem constante de 90 V por quatro horas em sistema de eletroforese horizontal LCH 20x25 (Loccus Biotecnologia®, Brasil). Os tamanhos dos fragmentos obtidos foram comparados com o marcador molecular de 100 bp DNA Ladder (KAPA, EUA).

Após a corrida eletroforética os géis foram corados com brometo de etídio (0,6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), por 20 minutos. Em seguida, os géis foram visualizados, fotografados e editados em transiluminador com luz UVB LTB-20x20 STi, fotodocumentador e software L-Pix STi, respectivamente (Loccus Biotecnologia®, Brasil).

## **Análise Estatística**

### **Análise dos fragmentos amplificados**

A matriz de presença (1) e ausência (0) de bandas (fragmentos amplificados) foi obtida a partir de avaliação visual das bandas mais definidas para cada *primer*, nos 27 indivíduos estudados. Os marcadores ISSR são de carácter dominante, portanto assume-se que cada banda representa o fenótipo em um loco bi-alélico (WILLIAMS *et al.*, 1990).

### **Diversidade Genética e Estrutura populacional**

A partir da matriz binária de presença e ausência e por meio da fórmula 1, obteve-se o percentual de polimorfismo para cada *primer* utilizado:

$$P = \frac{nbp}{ntb} \times 100 \quad (1)$$

Onde, P representa o percentual de polimorfismo do *primer*, nbp, o número de bandas polimórficas e ntb, o número total de bandas.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada *primer* foi calculado conforme proposto por Rezende *et al.* (2009):

$$PIC_{primer} = 1 - \sum_i \cdot \sum_j P_{ij}^2 \quad (2)$$

Onde, onde  $P_i$  é a frequência do alelo “p” no loco “ $p_i$ ” e  $P_{ij}$  é a frequência do alelo p, do loco  $i$ , no *primer*  $j$ .

A matriz de dissimilaridade genética entre cada par de indivíduos foi calculada a partir do coeficiente de Jaccard (3), que compara o número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (MEYER, 2002):

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} \quad (3)$$

Onde,

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

em que 'a' corresponde ao número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos; 'b', ao número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *i* e 'c', ao número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*.

A análise de agrupamentos através dos métodos hierárquicos UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*), Ward e SL (*Single Linkage* ou *Nearest Neighbor*) foram realizadas a partir da matriz de dissimilaridade e a escolha do método com maior consistência de agrupamento, foi baseada no coeficiente de correlação cofenética (CCC). As análises foram realizadas utilizando o programa GENES (CRUZ, 2016).

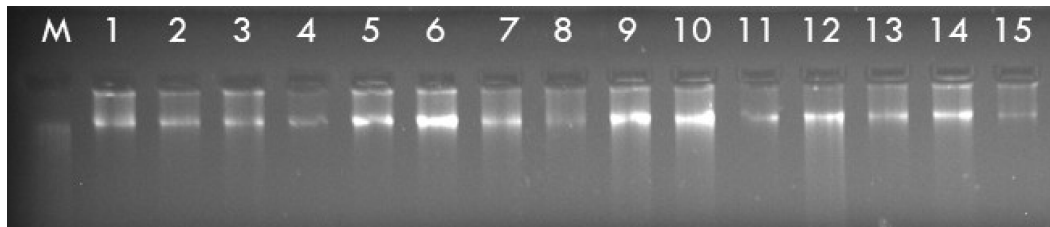
O programa Structure (PRITCHARD; WEN, 2004), baseado em análise bayesiana, foi utilizado para inferir a estrutura genética entre os indivíduos, indicando grupos genéticos distintos (K). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K (K = 4), 200.000 interações iniciais (*burn-ins*) e 500.000 simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios descritos por Pritchard e Wen (2004) e Evanno, Regnaut e Goudet (2005).

Para caracterização da variabilidade genética entre os grupos genéticos constituídos pela análise bayesiana foi calculada a diversidade genética de Nei (*He*) (NEI, 1978), o índice de diversidade de Shannon (*I*) (LEWONTIN, 1972) e o percentual de loci polimórficos (%P) a partir da análise da matriz binária de presença e ausência, utilizando o programa POPGENE 1.32 (YEH *et al.*, 2000). A diversidade genética entre e dentro dos grupos foi demonstrada a partir da AMOVA (Análise de Variância Molecular), de acordo com Excoffier, Smouse e Quattro (1992) e com auxílio do programa ARLEQUIN 3.01 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007).

## Resultados e Discussão

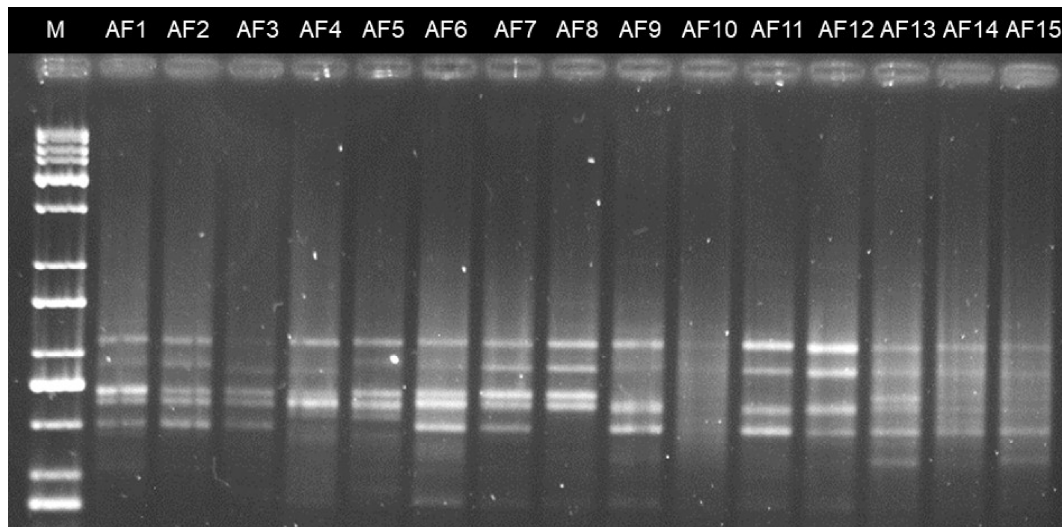
### Polimorfismo genético de *Copaifera langsdorffii* por meio de marcadores ISSR

O DNA extraído apresentou alta qualidade (Figura 3). Para Feres *et al.* (2005), o DNA de boa qualidade é fundamental para o sucesso das análises moleculares.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total de 15 amostras de *Copaifera langsdorffii*. M: DNA ladder de 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>.

Foi detectado um alto percentual de polimorfismo entre os indivíduos de *C. langsdorffii* com os 12 marcadores ISSR. Os fragmentos amplificados foram visualizados em imagens de géis de agarose, geradas no fotodocumentador (Figura 4).



**Figura 4.** Fotodocumentação de DNA amplificado com o primer UBC-816 dos indivíduos AF1 ao AF15 de *Copaifera langsdorffii*. M: Marcador Molecular de 100pb.

Os 12 *primers* utilizados amplificaram um total de 106 fragmentos, sendo 98,11% polimórficos. O número de fragmentos amplificados variou de 6 (UBC-828 e UBC-873) a 16 (UBC-810), com média de 8,83 fragmentos por *primer* (Tabela 2), indicando que os primers utilizados são eficazes na detecção

de polimorfismo genético na espécie e que há a presença de diversidade genética entre os indivíduos de *C. langsdorffii* amostrados. O alto percentual de polimorfismo encontrado neste trabalho assemelha-se ao encontrado por Dúcar *et al.* (2018) (99,80%) que avaliaram a diversidade genética de oito espécies de *Lotus* sp. (Fabaceae), bem como o observado por Bagheri *et al.* (2020) (97,60%) que estudaram a variabilidade genética de *Astragalus subrecognitus* (Fabaceae), confirmando a eficácia dos marcadores ISSR na detecção de polimorfismo em espécies da Família Fabaceae.

**Tabela 2.** Número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (% P) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos primers utilizados na caracterização molecular de *Copaifera langsdorffii*.

<i>Primer</i>	NTF	NFP	%P	PIC
UBC – 808 DiAG3’C	9	9	100	0,66
UBC – 810 DiGA3’T	16	16	100	0,73
UBC – 816 DiCA3’T	7	6	85,71	0,45
UBC – 817 DiCA3’A	10	10	100	0,69
UBC – 818 DiCA3’G	9	9	100	0,79
UBC – 825 DiAC3’T	8	7	87,5	0,71
UBC – 828 DiTG3’A	6	6	100	0,68
UBC – 829 DiTG3’C	12	12	100	0,72
UBC – 834 DiAG3’YT	7	7	100	0,59
UBC – 873 (GACA <sub>4</sub> )	6	6	100	0,81
DiCA5’CR	9	9	100	0,56
DiCA5’CY	7	7	100	0,64
Total	106	104	98,11	-
Média	8,83	11,6	97,77	0,67

O conteúdo de Informação polimórfica (PIC) de cada *primer* variou entre 0,45 (UBC-816) e 0,81 (UBC-873), demonstrando serem altamente informativos. Onze *primers* utilizados neste estudo podem ser considerados como muito informativos para *C. langsdorffii*, já que apresentaram valores de PIC

acima de 0,5, apenas o *primer* UBC-816 apresentou valor entre 0,25 e 0,50, o que o torna moderadamente informativo. Para Botstein *et al.* (1980), os marcadores moleculares que apresentam valores de PIC abaixo de 0,25 são considerados pouco informativos, aqueles com valores entre 0,25 e 0,50 são classificados como medianamente informativos e acima de 0,50 muito informativos.

### **Diversidade e estrutura genética de *Copaifera langsdorffii***

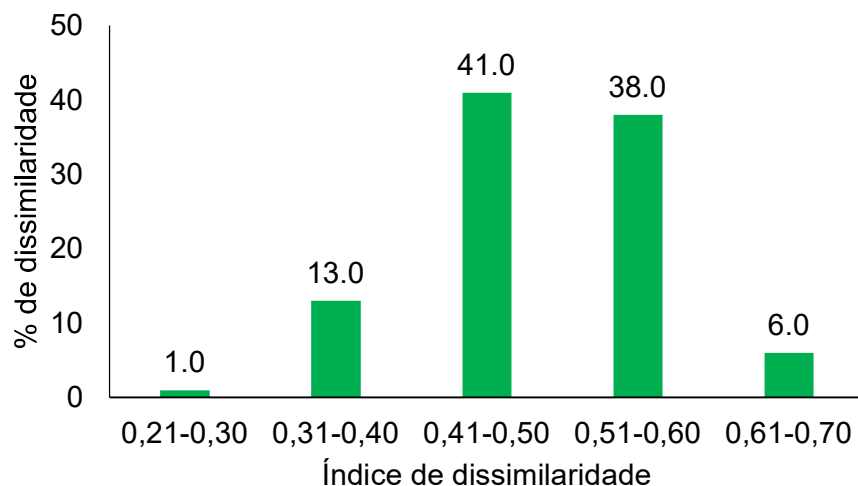
Os valores de dissimilaridade genética observados entre os indivíduos variaram de 0,24 a 0,69 (Tabela 3). Os indivíduos menos dissimilares geneticamente foram AF20 e AF21, e AF24 e AF25, ambos os pares com 0,24, sendo todos pertencentes a subunidade amostral IV, e os mais dissimilares, segundo a matriz de dissimilaridade genética, foram AF5 e AF27 com 0,69, pertencentes as subunidades amostrais II e IV, respetivamente, as mais distantes entre si geograficamente, podendo tratar-se de indivíduos com parentais de outras regiões.

Entre as combinações, 41% encontram-se dentro da faixa 0,41-0,50 (Figura 5). A média de dissimilaridade encontrada foi 0,49, similar ao encontrado por Brito *et al.* (2016) para a espécie *Varronia curassavica*, o que segundo os autores indica uma alta diversidade genética entre muitos pares de indivíduos. Os dados de dissimilaridade indicam que não há evidência de indivíduos idênticos em termos genéticos, e assim, todos possuem potencial para compor bancos de germoplasma.

**Tabela 3.** Matriz de dissimilaridade genética entre 27 indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf. calculada com base no complemento do coeficiente de Jaccard, utilizando 106 fragmentos ISSR.

AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	AF9	AF10	AF11	AF12	AF13	AF14	AF15	AF16	AF17	AF18	AF19	AF20	AF21	AF22	AF23	AF24	AF25	AF26	AF27		
0	0,40	0,46	0,51	0,41	0,45	0,39	0,40	0,37	0,56	0,48	0,48	0,52	0,59	0,56	0,48	0,56	0,48	0,40	0,35	0,46	0,43	0,61	0,49	0,55	0,47	0,55	AF1	
	0	0,39	0,39	0,40	0,46	0,34	0,48	0,47	0,49	0,49	0,44	0,58	0,52	0,56	0,55	0,64	0,51	0,53	0,50	0,52	0,54	0,57	0,53	0,57	0,54	0,67	AF2	
		0	0,44	0,42	0,48	0,30	0,47	0,42	0,48	0,41	0,46	0,57	0,56	0,55	0,52	0,63	0,53	0,51	0,50	0,48	0,48	0,53	0,53	0,48	0,50	0,58	0,64	AF3
			0	0,38	0,52	0,40	0,41	0,47	0,53	0,55	0,46	0,49	0,51	0,57	0,54	0,58	0,49	0,51	0,50	0,49	0,55	0,60	0,48	0,54	0,54	0,55	0,64	AF4
				0	0,39	0,44	0,41	0,45	0,49	0,49	0,51	0,52	0,51	0,63	0,56	0,61	0,55	0,44	0,44	0,54	0,49	0,56	0,62	0,53	0,57	0,61	0,69	AF5
					0	0,45	0,40	0,36	0,47	0,45	0,45	0,42	0,45	0,52	0,43	0,58	0,51	0,45	0,47	0,40	0,47	0,57	0,45	0,46	0,56	0,59	AF6	
						0	0,33	0,44	0,45	0,43	0,41	0,49	0,48	0,55	0,55	0,51	0,48	0,54	0,53	0,45	0,43	0,51	0,49	0,50	0,53	0,61	AF7	
							0	0,42	0,49	0,51	0,53	0,54	0,49	0,54	0,54	0,59	0,53	0,46	0,51	0,44	0,44	0,49	0,58	0,51	0,53	0,58	0,65	AF8
								0	0,55	0,38	0,41	0,49	0,51	0,49	0,45	0,61	0,43	0,46	0,35	0,38	0,47	0,55	0,46	0,45	0,59	0,54	AF9	
									0	0,43	0,44	0,45	0,46	0,56	0,50	0,56	0,55	0,49	0,56	0,49	0,57	0,55	0,60	0,55	0,60	0,66	AF10	
										0	0,27	0,40	0,46	0,51	0,38	0,63	0,42	0,43	0,40	0,28	0,46	0,54	0,47	0,42	0,51	0,45	AF11	
											0	0,36	0,40	0,43	0,40	0,55	0,47	0,51	0,44	0,37	0,53	0,53	0,44	0,43	0,47	0,48	AF12	
												0	0,36	0,39	0,45	0,56	0,44	0,50	0,41	0,31	0,45	0,56	0,51	0,43	0,54	0,51	AF13	
													0	0,32	0,46	0,61	0,49	0,53	0,58	0,45	0,49	0,50	0,56	0,53	0,54	0,63	AF14	
														0	0,49	0,60	0,49	0,54	0,55	0,47	0,51	0,55	0,55	0,53	0,54	0,61	AF15	
															0	0,55	0,41	0,42	0,40	0,35	0,48	0,50	0,44	0,45	0,47	0,46	AF16	
																0	0,55	0,59	0,62	0,54	0,45	0,59	0,54	0,55	0,56	0,61	AF17	
																	0	0,40	0,41	0,36	0,39	0,55	0,55	0,49	0,53	0,51	AF18	
																		0	0,37	0,40	0,44	0,58	0,47	0,51	0,54	0,58	AF19	
																			0	0,24	0,34	0,42	0,42	0,36	0,42	0,39	AF20	
																				0	0,33	0,47	0,42	0,36	0,42	0,39	AF21	
																					0	0,49	0,50	0,43	0,49	0,54	AF22	
																						0	0,53	0,51	0,48	0,58	AF23	
																							0	0,24	0,35	0,40	AF24	
																								0	0,36	0,40	AF25	
																									0	0,41	AF26	
																										0	AF27	





**Figura 5.** Distribuição da dissimilaridade genética entre os pares de indivíduos de *Copaifera langsdorffii*.

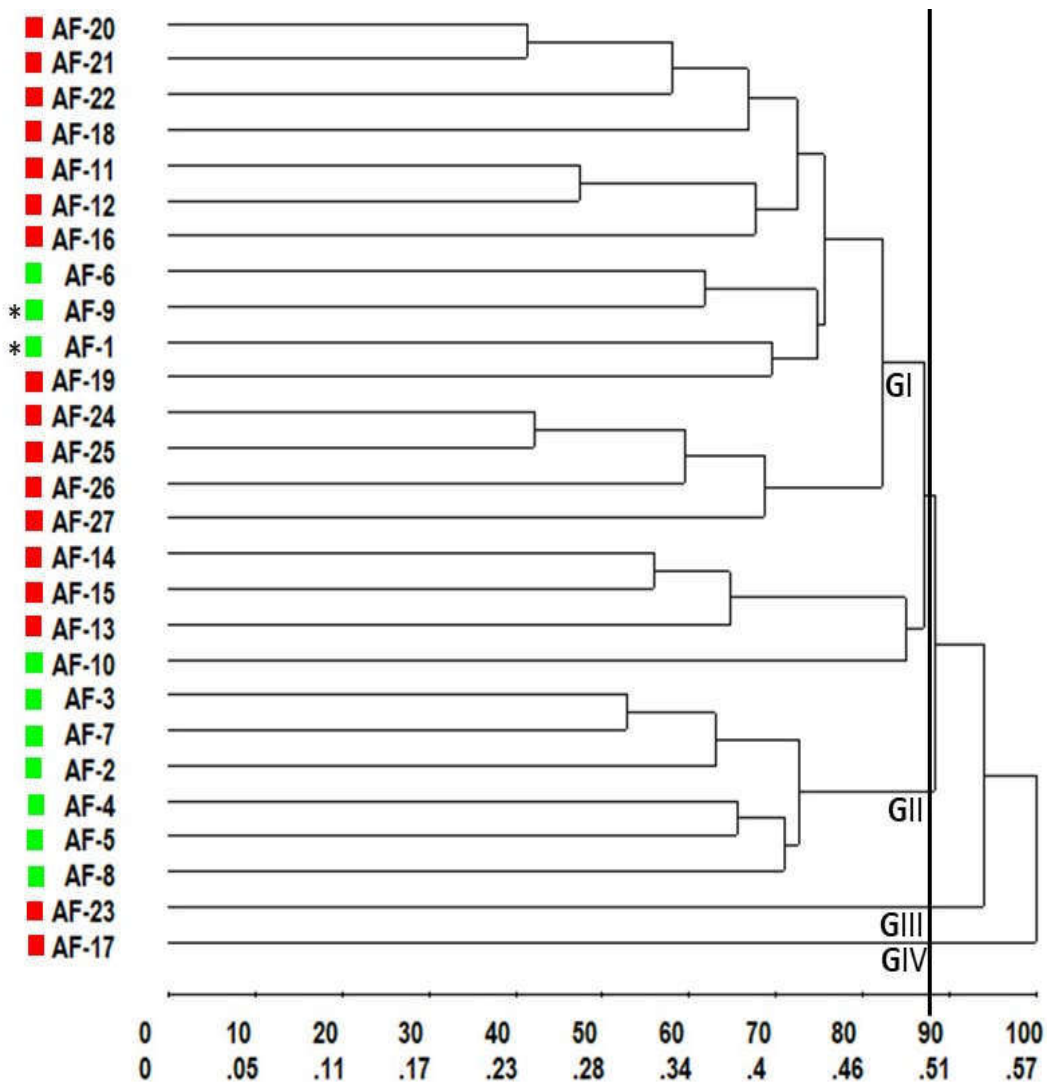
Entre os métodos de agrupamento testados, o UPGMA apresentou maior coeficiente de correlação cofenética (CCC) (0,728), menor estresse (10,39) e distorção (1,08) (Tabela 4). Segundo Rohlf (1970), valores de CCC superiores a 0,70 são classificados como satisfatórios, indicando neste estudo, um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a matriz cofenética.

**Tabela 4.** Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), estresse e distorção dos métodos Ward, Vizinho mais Próximo (SL) e UPGMA para a inferência do agrupamento hierárquico.

	Ward	SL	UPGMA
<b>CCC</b>	0,6164	0,6127	0,728
<b>Estresse (%)</b>	-	23,89	10,39
<b>Distorção(%)</b>	-	38,18	1,08

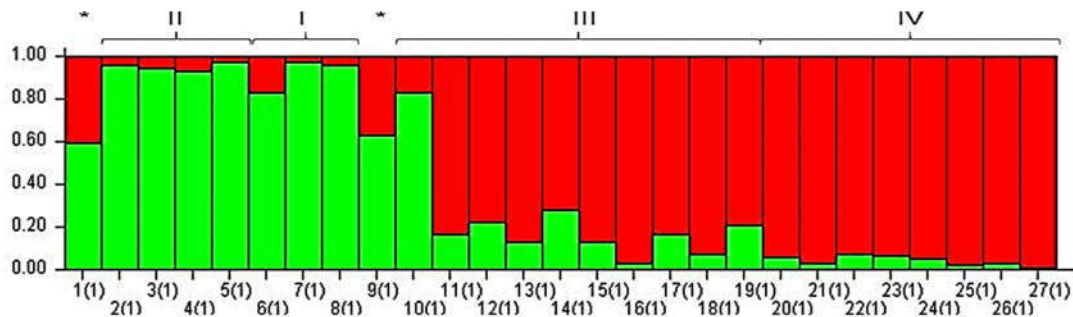
O dendrograma de dissimilaridade genética baseado nos ISSR foi gerado pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade, formando 4 grupos (GI, GII, GIII, GIV) (Figura 6). O ponto de corte 0,505 (87,75%) foi definido conforme metodologia proposta por Mojena (1977). O GI é composto por 19 indivíduos (AF1, AF6, AF9, AF10, AF11, AF12, AF13, AF14, AF15, AF16, AF18, AF19, AF20, AF21, AF22, AF24, AF25, AF26, AF27), o GII contém 6

indivíduos (AF2, AF3, AF4, AF5, AF7, AF8), e GIII (AF23) e GIV (AF17), são formados por apenas um indivíduo.



**Figura 6.** Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 27 indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf., obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade. As marcações em verde e vermelho correspondem aos grupos gerados pelo Structure (Ver figura 7). \*indivíduos mais diferentes dos demais dentro do grupo A no Structure.

A análise bayesiana demonstrou a existência de 2 grupos distintos ( $k = 2$ ) denominados de A e B, (Figura 7) concordando com o agrupamento gerado pelo UPGMA para muitos indivíduos. O grupo A representado pela coloração verde na figura 7, é composto pelos indivíduos AF1 a AF10. Já no grupo B (coloração vermelha) foram alocados os demais indivíduos, do AF11 ao AF27.



**Figura 7.** Agrupamento obtido por meio da análise bayesiana dos 27 indivíduos de *Copaifera langsdorffii* Desf. Os indivíduos estão representados por barras verticais com coloração de acordo com o grupo ao qual pertencem (dois grupos, K= 2). \*Indivíduos mais diferentes dentro do grupo A.

Em uma comparação dos resultados entre os agrupamentos gerados a partir da bayesiana e do UPGMA, pode-se destacar que os indivíduos do grupo A compõem o agrupamento GII do UPGMA, com exceção para os indivíduos AF1, AF6, AF9 e AF10, que na análise baseada na matriz de dissimilaridade, foram alocados no agrupamento GI. É importante considerar que os indivíduos AF1 e AF9 foram os mais distintos dentro do grupo A. Além disso, na análise bayesiana os indivíduos AF5 e AF27 se mostraram os mais distintos geneticamente, corroborando com o resultado observado na matriz de dissimilaridade.

Correlacionando os grupos obtidos pelo UPGMA e *Structure* com as subunidades amostrais, observamos que os indivíduos pertencentes às subunidades amostrais I e II foram agrupados dentro do grupo A, e no UPGMA constituíram em sua maioria o GII. Já os indivíduos das subunidades amostrais III e IV, que são mais distantes geograficamente entre si, formaram o grupo B e no UPGMA formaram em sua maioria o GI. Os indivíduos de GIII e GIV do UPGMA (formados por AF17 e AF23, respectivamente) pertencem as subunidades amostrais III e IV, respectivamente, e na análise bayesiana se alocaram dentro do grupo B. Estes indivíduos apresentam índice de dissimilaridade genética de 0,59 (Tabela 3), estando acima da média encontrada nesse estudo (0,49), destacando seu potencial para coleta de material genético para integrar bancos de germoplasmas.

A disposição dos indivíduos de diferentes subunidades amostrais no mesmo agrupamento genético pode ser explicada pelo fato de seus principais dispersores serem aves (RABELLO; RAMOS; HASUI, 2010), o que permite a

dispersão à longas distâncias. Segundo Trollet *et al.* 2017, Martins-Oliveira *et al.* 2020 essa relação planta-frugívoro tem um papel fundamental na estrutura florestal, podendo ser um dos principais mecanismos de dispersão das espécies vegetais.

Os índices de diversidade genética foram calculados a partir dos agrupamentos (k=2) obtidos na análise bayesiana (Tabela 5). A porcentagem de polimorfismo variou entre 74,53 e 88,68%, sendo que o percentual total foi de 92,45%, indicando uma alta diversidade genética. Esses dados de alta diversidade genética também foram observados por Martins *et al.* (2008) que estudou populações de *Copaifera langsdorffii* no pontal do Paranapanema, no Estado de São Paulo, por meio da análise de marcadores microssatélites, bem como por Sebbenn *et al.* 2010, avaliando uma população de *C. langsdorffii* no município de São Jose do Rio Preto, Estado de São Paulo.

Os grupos A e B da análise bayesiana, apresentaram respectivamente, índice de Shannon (I) de 0,37 e 0,46. Guerra *et al.* (2018), encontram índices semelhantes (entre 0,36 e 0,39) ao avaliar a diversidade genética em *Adesmia bijuga* Phil com marcadores ISSR. Os valores de Diversidade genética de Nei foram 0,24 e 0,31 para os grupos A e grupo B, respectivamente. Observamos que o grupo B apresenta a maior diversidade genética, bem como os maiores valores para os índices (Shannon e Nei), o que pode estar associado a distância geográfica entre os indivíduos.

**Tabela 5.** Diversidade genética intrapopulacional de *Copaifera langsdorffii* dos grupos A e B obtidos na análise bayesiana.

Parâmetros	Grupo A	Grupo B	Total
N	10	17	27
Na	1,74 (±0,44)	1,88 (±0,32)	1,92 (±0,27)
Ne	1,41 (±0,36)	1,53 (±0,36)	1,53 (±0,33)
He	0,24 (±0,19)	0,31 (±0,17)	0,32 (±0,16)
I	0,37 (±0,26)	0,46 (±0,23)	0,48 (±0,21)
%P	74,53	88,68	92,45

N: número de indivíduos; Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; He: Diversidade Genética de Nei; I: Índice de Shannon e %P: Percentual de loci polimórficos.

A análise de variância molecular (AMOVA) também baseada nos dois grupos obtidos pela análise bayesiana, indicou que a maior variabilidade genética encontra-se dentro de cada grupo (85,84% de variância total) e não entre eles, o que pode ser observado na tabela 6. O valor de diferenciação

genética dos grupos ( $F_{ST}$ ) foi de 0,14162, com 1023 permutações ao acaso, indicando que entre os grupos a variação é de aproximadamente 14%. A baixa diferenciação genética entre os grupos já era esperada, pois os indivíduos amostrados são plantas adultos que possivelmente já formaram uma única população. A distância geográfica entre os grupos é pequena, sendo que o grupo B é composto pelos indivíduos mais distantes entre si, pertencentes as subunidades amostrais III e IV. Segundo Gonçalves *et al.* (2016) uma maior variabilidade genética intrapopulacional permite um maior número de combinações, o que favorece possíveis adaptações diante de mudanças ambientais.

**Tabela 6.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) dos dois grupos ( $k=2$ ), determinados pela análise bayesiana para os 27 indivíduos de *Copaifera langsdorffii*, com uso de 12 primers ISSR.

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	VT (%)	$F_{ST}$	P
Entre Grupos	1	39,232	2,10314	14,16	0,14162	<0,000
Dentro dos grupos	25	318,694	12,74776	85,84		
Total	26	357,926	14,85091			

Componente de Variância (CV), Variância Total (VT), Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) e Probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso (P).

Nybom (2004) constatou, analisando trabalhos realizados com marcadores dominantes, que plantas de vida longa, alógamas e com estágio sucessional tardio apresentavam maior variabilidade genética dentro das populações, o que está de acordo com as características e estilo de vida da *Copaifera langsdorffii*.

Diante do cenário brasileiro de degradação florestal, a diversidade genética encontrada entre os indivíduos de *Copaifera langsdorffii* corroboram com a importância da preservação florestal, visto que, segundo o Instituto do homem e Meio ambiente da Amazônia – IMAZON (2020), dos 283 quilômetros quadrados de florestas degradadas na Amazônia Legal registrados em julho de 2020, 78% estão no Estado de Mato Grosso. Sugerimos a criação de corredores ecológicos para ligar os fragmentos, ou pelo menos aproximá-los, visando tornar o fluxo gênico mais viável. Segundo Martins *et al.* (2008) a conectividade entre fragmentos facilita a manutenção da diversidade genética, e permite a movimentação da fauna, possibilitando a dispersão de sementes de espécies zoocóricas (TROLLIET *et al.*, 2017; MARTINS-OLIVEIRA *et al.*, 2020).

## **Conclusões**

O percentual de polimorfismo, valores de dissimilaridade genética e índices de diversidade genética confirmam que há variabilidade genética entre os indivíduos de *C. langsdorffii*.

Os métodos de agrupamento utilizados revelaram proximidade genética entre os indivíduos das subunidades amostrais I e II, e III e IV. A maior variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos e não entre eles. Sendo que o grupo B obtido na análise bayesiana, abriga os indivíduos mais distantes geograficamente entre si.

Os resultados obtidos indicam que os indivíduos de *C. langsdorffii* avaliados possuem alta diversidade genética, assim apresentam potencial para compor programas que visem a preservação da espécie e capacidade de integrar bancos de germoplasma.

## Referências Bibliográficas

- ALVARES, C.A. *et al.* Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711–728, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1127/09412948/2013/0507>.
- BAGHERI, A. *et al.* Genetic structure and conservation status of *Astragalus subrecognitus* (Fabaceae): a very rare and narrow endemic species Plant. **Ecology and Evolution**, v.153, n.1, p.101–107, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5091/plecevo.2020.1648>.
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, n.3, p.314-331, 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6247908/>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.
- BORÉM, A., CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. 3. ed. Viçosa: UFV. 385p. 2016.
- BRITO, F.A. *et al.* Genetic diversity analysis of *Varronia curassavica* Jacq. Accessions using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, 2016. DOI: 10.4238 / gmr.15038681.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras; recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Curitiba: EMRAPA/CNPF: Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640p. Disponível em: [https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index\\_especies.htm](https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index_especies.htm). Acesso em: 20 de junho de 2020.
- CASCON, V. Copaíba - *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/289499092\\_Fitoterapicos\\_Anti-inflamatorios\\_aspectos\\_quimicos\\_farmacologicos\\_e\\_terapeuticos](https://www.researchgate.net/publication/289499092_Fitoterapicos_Anti-inflamatorios_aspectos_quimicos_farmacologicos_e_terapeuticos). Acesso em: 14 de outubro de 2020.
- COSTA, D.F. *et al.* Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocenaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.4, p.970-976, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-246/14>.
- CORDEIRO, A.G.M. *et al.* Diversidade genética entre cupuízeiros nativos do Portal da Amazônia, Mato Grosso, Brasil. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n.3, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1332020833>.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v.38, n.4, p.547-552, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>.

- DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities Of fresh leaf tissue**. *Phytochemical bulletin*, v.19, p.1115, 1987.
- DÚCAR, E. *et al.* Comparison of the genome size, endoreduplication, and ISSR marker polymorphism in eight *Lotus* (Fabaceae) species. **Turkish Journal of Botany**, v.42, p.1-14, 2018. DOI:10.3906/bot-1703-61.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Biology**, v.14, p.2611-2620, 2005. DOI: 10.1111 / j.1365-294X.2005.02553.x.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin: a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva: University of Geneva, 2007. DOI: doi.org/10.1177/117693430500100003.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, n.2, p.179-191, 1992. Disponível em:  
<http://labs.icb.ufmg.br/lbem/aulas/pg/apipop/praticas/arlequin2/excoffier92g-human-mtdnahap.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2020.
- FERES, F. *et al.* Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p.277-283, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200008>.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Ed. 3, EMBRAPA, Brasília-DF, 1998. Disponível em:  
[https://www.researchgate.net/publication/312465988\\_Introducao\\_ao\\_uso\\_de\\_marcadores\\_moleculares\\_em\\_analise\\_genetica](https://www.researchgate.net/publication/312465988_Introducao_ao_uso_de_marcadores_moleculares_em_analise_genetica). Acesso em: 15 de junho de 2020.
- FLORA DO BRASIL. *Copaifera L.* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em:  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.
- HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomares de sementes de espécies nativas - situação atual**. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Eds.). Pomar de sementes de espécies florestais nativas. Curitiba: FUPEF, 2006. p.13-40. Disponível em:  
<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.
- ICMBIO. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. Ministério do meio ambiente. Amazônia. Disponível em:  
<https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/amazonia>. Acesso em: 10 de dezembro de 2020.



IMAZON. Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia. **Boletim do desmatamento da Amazônia Legal (julho de 2020)**. Disponível em: <https://amazon.org.br>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

LEWONTIN, R. C. **The Apportionment of Human Diversity Committee on Evolutionary Biology**. University of Chicago, p.381-398, 1972. Disponível em: <https://emilkirkegaard.dk/en/wp-content/uploads/Lewontin-1972-The-Apportionment-of-Human-Diversity.pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

MARTINS, K. *et al.* Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no portal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000100007>.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859304>.

MARTINS-OLIVEIRA, A.T. *et al.* Estrutura e síndromes de dispersão da vegetação arbórea em floresta nativa e agrofloresta, na Amazônia meridional. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 43, n.3, p.352-362, 2020. DOI: <https://doi.org/10.19084/rca.19602>.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, p.118, 2002.

MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v.20, n.4, p.359-363, 1977. DOI:10.1093/comjnl/20.4.359.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978. Disponível em: <https://www.genetics.org/content/89/3/583>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

NG, W.L.; TAN, S.G. Inter-simple Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right? **ASM Science Journal**, v.9, n.1, p.30-39, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/283256624\\_Inter-Simple\\_Sequence\\_Repeat\\_ISSR\\_markers\\_Are\\_we\\_doing\\_it\\_right](https://www.researchgate.net/publication/283256624_Inter-Simple_Sequence_Repeat_ISSR_markers_Are_we_doing_it_right). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

OLIVEIRA, R. A. de. *et al.* Proposição de Corredor Ecológico entre duas Unidades de Conservação na Região Metropolitana de Sorocaba. **Revista do Departamento de Geografia**, v.32, p.61-71, 2016. DOI: <https://doi.org/10.11606/rdg.v32i0.116467>.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista**

**Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.465-472, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400016>.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for Structure software: Version 2.1**. 2004. Disponível em <<http://pritch.bsd.uchicago.edu>>. Acesso em 20 de junho de 2019.

RABELLO, A.; RAMOS, F.N.; HASUI, É. Efeito do tamanho do fragmento na dispersão de sementes de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Delf.). **Biota Neotropica**, v..10, n.1, p.47-54, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000100004>.

REZENDE, R. K. S. *et al.* Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.39, n.8, nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000176>.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, I. (Orgs.). **Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo: LERF/ESALQ; Instituto BioAtlântica, 2009. 256p. Disponível em: <http://www.lerf.esalq.usp.br/divulgacao/produzidos/livros/pacto2009.pdf>. Acesso em: 20 de junho de 2019.

ROHLF, F.J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v.19, n.1, p.58-82, 1970.

SANTOS, F. R. *et al.* Diversidade Genética. **Biota Minas**, p.389-410, 2010. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/pdf/santos09biotaminas-divgen.pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

SEBBENN, A.M. *et al.* Baixos níveis de fluxo gênico de sementes e pólen realizados e forte estrutura genética espacial em uma população pequena, isolada e fragmentada da árvore tropical *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, p.134–145, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.33>.

SOUZA, L.C.; SOUZA, M.C.; PEREIRA, A.G. Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathymenia reticulata* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.13, n.1, e5491, 2018. DOI: [10.5039/agraria.v13i1a5491](https://doi.org/10.5039/agraria.v13i1a5491).

TROLLIET, F. *et al.* Aves frugívoras influenciam a organização espacial das florestas tropicais através da geração de focos de recrutamento de mudas sob ambiente zoocórico. **Acta Oecologica**, 85, p. 69-76, 2017. DOI: [10.1016/j.actao.2017.09.010](https://doi.org/10.1016/j.actao.2017.09.010).

TURCHETTO, C. *et al.* **Marcadores genéticos baseados em DNA. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.12-20, 2017. Disponível em: [https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Revista Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>.

WILLIAMS, J. G. K.*et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-653, 1990. DOI: 10.1093 / nar / 18.22.6531.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, n. 20, p. 176-183, 1994.

YEH, E.*et al.* Dynamic Positioning of Mitotic Spindles in Yeast: Role of Microtubule Motors and Cortical Determinants. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, p.3949-3961, 2000. DOI: 10.1091/mbc.11.11.3949.

### **3.2 POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE *Copaifera langsdorffii* Desf.**

**Resumo** – (Potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de *Copaifera langsdorffii* Desf.). A floresta Amazônica abriga a maior biodiversidade do planeta e possui em sua flora diversas plantas com potencial medicinal. Entre as plantas utilizadas como fitoterápicas na Amazônia temos a *Copaifera langsdorffii* Desf., utilizada como antiastmático, para amigdalite e uso tópico para eczemas, tendo suas folhas potencial para tratar urolitíase. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de *Copaifera langsdorffii* por meio do teste *Allium cepa*. Os bulbos foram organizados em um esquema fatorial (2 x 5 + 2), sendo dois extratos (infuso e decocto), obtidos da casca do caule e das folhas da *Copaifera langsdorffii*, cinco concentrações: 0,002; 0,004; 0,008; 0,016 e 0,032 mg ml<sup>-1</sup>, e dois controles: água destilada (controle negativo) e glifosato (controle positivo). Foram avaliados o crescimento do sistema radicular (CSR), o índice mitótico (IM), e a frequência de alterações cromossômicas e/ou anormalidades nas fases da divisão celular. Nos extratos da casca do caule, foram encontradas as maiores reduções de CSR na concentração 0,016 mg mL<sup>-1</sup> do extrato decocto, bem como os menores IM na concentração 0,032 mg mL<sup>-1</sup> de ambos os extratos. As concentrações 0,002 mg mL<sup>-1</sup> do extrato infuso da casca e 0,004 mg mL<sup>-1</sup> do extrato decocto das folhas apresentaram, respectivamente, 4,19 e 3,55 % de alterações celulares. A concentração usualmente utilizada (0,008 mg ml<sup>-1</sup>) apresentou aberrações em todos os extratos aquosos avaliados. A redução do CSR e IM e a presença de aberrações no organismo teste, evidenciaram o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de *Copaifera langsdorffii*.

Palavras-chave: Copaíba, Índice mitótico, *Allium cepa*.

**Abstract** – (Toxic, cytotoxic and genotoxic potential of *Copaifera langsdorffii* Desf.). The Amazon rainforest harbor the greatest biodiversity on the planet, and has in its flora, several species with medicinal potential. Among the amazon plants used as phytotherapics, in the Amazon there are *Copaifera langsdorffii* Desf. This species is used as an anti asthma, for tonsillitis and eczema, with its leaves having the potential to treat urolithiasis. The aim of this study was to evaluate the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of *Copaifera langsdorffii* using *Allium cepa* test. The bulbs were organized in a factorial scheme (2 x 5 + 2), with two extracts (infused and decocted), obtained from stem bark and leaves of *Copaifera langsdorffii*, five concentrations: 0.002; 0.004; 0.008; 0.016 and 0.032 mg ml<sup>-1</sup>, and two controls distilled water (negative control) and glyphosate at 1% (positive control). It was evaluated the growth of the root system (CSR), the mitotic index (IM), and frequency os chromosomal changes and/or abnormalities on cell cycle phases. In the stem bark extracts, the greatest reduction of CSR was found in the concentration 0.016 mg ml<sup>-1</sup> of the decocted extract, as well as the lowest IM in the concentration 0.032 mg ml<sup>-1</sup> of both extracts. The concentrations 0.002 mg ml<sup>-1</sup> of the infused bark extract and 0.004 mg ml<sup>-1</sup> of the decocted leaves extract showed 4.19 and 3.55% of cell abnormalities, respectively. The concentration usually used in folk medicine showed aberrations in all evaluated aqueous extracts. The reduction of CSR and IM and the presence of aberrations in the tested organism, showed the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of *Copaifera langsdorffii*.

Keywords: *Allium cepa*, Copaíba, Mitotic Index.

## Introdução

A floresta Amazônica abriga a maior biodiversidade do planeta; é responsável por fixar 1,5 bilhões de toneladas de carbono anualmente e desempenha função fundamental na regulação do clima regional e global (BOUBLI; HRBEK, 2012). Sua flora apresenta potencial altamente relevante, com diversas plantas produtoras de látex, gorduras e resinas, além de potencial medicinal (COSTA; ALVES, 2018). A tradição de uso de plantas medicinais na Amazônia se baseia em conhecimento e saberes oriundos de diferentes culturas (SANTOS, 2000). Entre as plantas utilizadas como fitoterápicas na região temos a *Copaifera langsdorffii* Desf.

A *Copaifera langsdorffii* é considerada a espécie mais amplamente distribuída no Brasil (CARVALHO, 1994; RIGMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2004), sendo conhecida também como pau-d'óleo, podói, cupaúba, cupiúva (LISBOA *et al.*, 2018) e copaíba. Além do óleo, também são utilizadas suas flores na produção de mel e suas mudas em reflorestamentos (CARVALHO, 1994). Messias *et al.* (2015) apontaram o uso da casca do caule como antiasmático, para amigdalite e uso tópico para eczemas, enquanto Brancalion *et al.* (2012) sugeriram que suas folhas possuem potencial para tratar urolitíase.

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, nos países em desenvolvimento cerca de 85% da população utiliza plantas medicinais para os cuidados básicos com a saúde (BRASIL, 2006). No entanto, as plantas produzem diversos metabólitos secundários relacionados ao seu desenvolvimento e proteção (FREITAS *et al.*, 2019), que podem causar em seres humanos reações adversas, como alergias, distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e em alguns casos o óbito (VASCONCELOS; VIERA; VIEIRA, 2009; CAMPOS *et al.*, 2016).

Franco *et al.* (2016), avaliando a alelopatia das folhas de *C. langsdorffii* encontraram a presença de terpenos, ácidos fenólicos e glicosídeos flavonoides. Já Lisboa *et al.* (2018) observaram por meio de análises fitoquímicas a presença de taninos, alcaloides e flavonoides na casca da *C. langsdorffii*. Dentre os efeitos tóxicos causados pelas substâncias produzidas pelas plantas, estão a toxicidade, citotoxicidade e a genotoxicidade. Já avaliados com outras

espécies arbóreas como: *Syzygium malaccense* (FREITAS *et al.*, 2019), *Ginkgo biloba* L. (GUEDES *et al.*, 2018) e *Hancornia speciosa* (RIBEIRO *et al.*, 2016). No entanto para a *C. langsdorffii* foram realizados estudos relacionados ao seu potencial tóxico com seu óleo (LOURENÇO *et al.*, 2009), com extrato aquoso obtido por meio do pó da casca (SENIGALIA *et al.*, 2020) e extrato etanólico obtido por meio de suas folhas e casca (AZEVEDO *et al.*, 2019) e não com os extratos aquosos obtidos por meio de infusão e decocção.

A toxicidade pode ser mensurada pela redução do crescimento do sistema radicular, enquanto a citotoxicidade e genotoxicidade pelo índice mitótico e presença de alterações cromossômicas e/ou anormalidades na divisão celular (ALMEIDA *et al.*, 2019), sendo o teste *Allium cepa* L. um bioindicador de possíveis efeitos de produtos químicos, extratos de plantas e misturas complexas sobre a atividade celular (HISTER *et al.*, 2017).

O teste *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente bioteste (MOROSINI, 2008; PORTIS *et al.*, 2016). A eficiência do sistema *A. cepa* se deve às suas características cinéticas de proliferação, além de apresentar baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular (BELCAVELLO *et al.*, 2012).

Assim, neste capítulo avaliamos diferentes concentrações dos extratos aquosos, do tipo infuso e decocto, da casca do caule e das folhas de *Copaifera langsdorffii* sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, objetivando encontrar possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxico.

## **Material e métodos**

Para a realização do experimento foram coletadas casca do caule e folhas de indivíduos adultos de *C. langsdorffii*, levadas posteriormente ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) localizado no Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional (CEPTAM), da Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Campus Universitário de Alta Floresta, Alta Floresta, MT, onde foi realizado o experimento.

### **Extratos aquosos**

A obtenção dos extratos aquosos da casca do caule e das folhas de *C. langsdorffii*, foi realizada por meio do preparo dos extratos aquosos do tipo infuso (EAI) e decocto (EAD). As concentrações dos extratos aquosos foram definidas a partir da dosagem usual utilizada na medicina popular (0,008 mg mL<sup>-1</sup>) e com base nessa, foram obtidas cinco concentrações: 0,002 mg mL<sup>-1</sup>, 0,004 mg mL<sup>-1</sup>, 0,008 mg mL<sup>-1</sup>, 0,016 mg mL<sup>-1</sup> e 0,032 mg mL<sup>-1</sup>. Sendo preparado inicialmente o extrato de maior concentração (0,032 mg mL<sup>-1</sup>), utilizando 32g do material vegetal (casca/folha) de *C. langsdorffii* para 1L de água destilada, e a partir deste extrato foram obtidas as demais concentrações por meio de diluições.

O tempo de preparo dos extratos aquosos foi determinado conforme orientativo para uso de fitoterápicos (CAMPINAS, 2018). O extrato aquoso do tipo infuso foi obtido por meio do aquecimento da água até o ponto de fervura (100 °C), sendo a mesma vertida sobre o material vegetal (casca ou folhas). O recipiente foi fechado e deixado em repouso por 10 minutos e, logo após, filtrado e diluído para obtenção das cinco concentrações.

Para o extrato aquoso do tipo decocto o material vegetal (casca do caule ou folhas) foi colocado em um recipiente juntamente com a água e levado ao fogo por cinco minutos, após o início da fervura. Ao atingir a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado e diluído nas concentrações supracitadas.

### **Teste *Allium cepa* L.**

O teste *A. cepa* foi realizado de acordo com a metodologia de Fiskesjö (1985), com alterações propostas por Babich, Segal e Fox (1997).



Foram utilizados 240 bulbos de *A. cepa*, das quais escamas externas e raízes secas foram retiradas cuidadosamente. Para o teste, utilizou-se o tratamento descontínuo, sendo os bulbos previamente colocados em água destilada para emissão de raízes e após 48h transferidos para os extratos aquosos a serem testados.

Os bulbos de *A. cepa* foram submetidos a cinco concentrações de extratos aquosos do tipo infuso e decocto, da casca do caule e das folhas. A água destilada, considerada como concentração 0 mg ml<sup>-1</sup>, foi utilizada como controle negativo e o herbicida glifosato (480g/L) diluído a 1% como controle positivo, devido sua ação citotóxica sobre o organismo teste ser comprovada (MERCADO; CALEÑO, 2020).

Os experimentos da casca do caule e das folhas foram conduzidos separadamente, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os bulbos organizados em um esquema fatorial (2 x 5 + 2), sendo dois tipos de extrato (EAI, EAD), cinco concentrações e dois tratamentos controle (água destilada e glifosato 1%), com 10 repetições cada, para cada uma das partes vegetais avaliadas (casca do caule e folhas).

Após a instalação dos experimentos, os bulbos foram mantidos em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), onde permaneceram em temperatura controlada (25 °C ± 2) e na ausência de luz por 48 horas, conforme metodologia proposta por Babich, Segal e Fox (1997).

#### **Avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico**

Para avaliação do potencial tóxico, após 48 horas expostos aos extratos de copaíba os bulbos foram retirados da câmara de germinação, e foram mensuradas ao acaso duas raízes de cada bulbo, totalizando 20 raízes de cada concentração dos EAI e EAD de cada parte vegetal (casca e folhas), assim como dos controles negativo e positivo, com auxílio de paquímetro digital Mitutoyo.

O potencial citotóxico foi obtido por meio do índice mitótico (IM) e o potencial genotóxico avaliado a partir da frequência de alterações cromossômicas e/ou anormalidades nas fases de divisão celular.

#### **Fixação e preparo de lâminas**

As raízes foram coletadas aleatoriamente de todos os bulbos expostos aos extratos aquosos, bem como aos controles negativo e positivo, e fixadas em solução fixadora (3:1, etanol: ácido acético) por 24 horas em

temperatura ambiente, sendo então transferidas para etanol 70% e mantidas sob refrigeração ( $\pm 4$  °C) até o uso.

Para o preparo das lâminas foi utilizada a metodologia proposta por Souza *et al.* (2005) em que as radículas foram lavadas em água destilada por cinco minutos, hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N por 15 minutos e novamente lavadas em água destilada por cinco minutos. Para confecção de cada lâmina foi utilizado o meristema apical de duas a três raízes, sendo este corado com, aproximadamente, 100  $\mu$ L deorceína acética 2%. Com auxílio de um bastão de vidro, o meristema foi levemente pressionado e, posteriormente, coberto com lamínula.

Foram preparadas dez lâminas por concentração de cada um dos extratos aquosos avaliados, assim como dos controles negativo e positivo. Foram analisadas 250 células por lâmina, totalizando 2.500 células para cada tratamento e 12.500 células por extrato aquoso. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (BIOVAL), em magnitude de 400x, pelo método de varredura, sendo registrado, para cada lâmina, o número de células em interfase e em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase, telófase), bem como as alterações em cada uma delas, quando presentes. O registro fotográfico foi realizado utilizando uma câmera digital CMOS (1.3 MP) colorida, acoplada ao microscópio e para captura e edição de imagem foi utilizado o software TSview.

#### **Determinação do índice mitótico**

O índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *A. cepa* foi obtido pela equação proposta por Pires *et al.* (2001) (1):

$$IM = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em mitose}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100 \quad (1)$$

O potencial de genotóxico foi estimado pela frequência de anomalias no ciclo mitótico (ACM), como anáfase com ruptura cromossômica, anáfase com ponte, telófase com ponte, metáfase irregular e metáfase poliploide.

#### **Análises estatísticas**

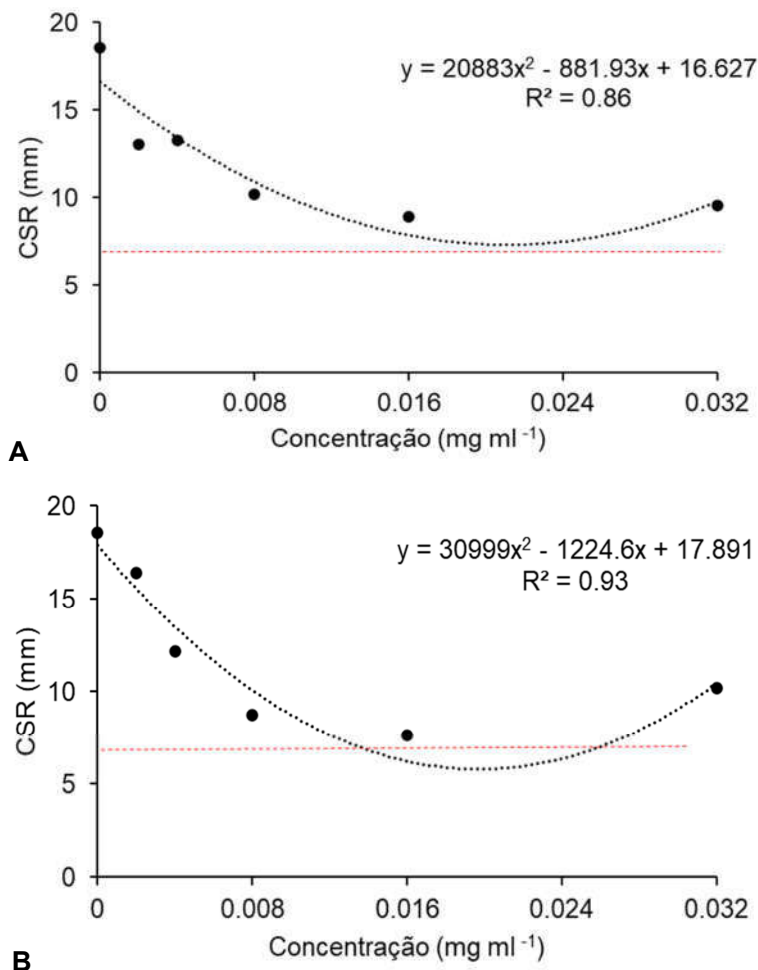
Os dados foram submetidos a teste para verificação da normalidade e à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para o fator concentração dos extratos foram ajustadas regressões polinomiais, sendo a escolha do modelo realizada com base no maior valor do

coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e no menor desvio. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Genes<sup>®</sup> (CRUZ, 2016).

## Resultados e Discussão

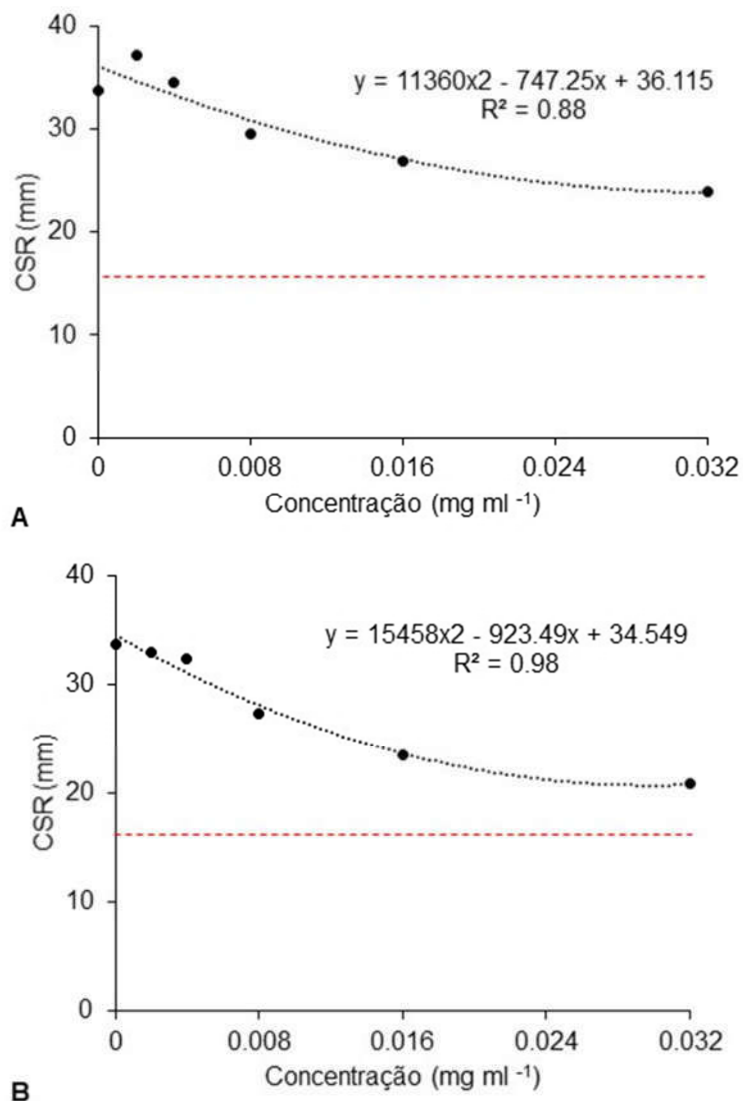
### Efeito tóxico dos extratos aquosos de *Copaifera langsdorffii*

Os extratos da casca do caule reduziram o CSR dos bulbos de *A. cepa* conforme o aumento da concentração, quando comparados ao controle negativo, o que também foi observado por Bezerra, Dinelly e Oliveira (2016) ao avaliar a ação dos extratos de *Plectranthus barbatus* sobre o ciclo celular de *A. cepa*, correlacionando assim o aumento da concentração do extrato aquoso com a diminuição do CSR do organismo teste. A concentração 0,016 mg mL<sup>-1</sup> apresentou maior redução do CSR nos dois extratos (Figura 1).



**Figura 1.** Crescimento do sistema radicular (CSR) dos bulbos de *Allium cepa* expostos aos extratos aquosos do tipo infuso e decocto (A e B, respectivamente) da casca do caule de *Copaifera langsdorffii*. A linha tracejada representa a média do CSR do controle positivo.

A média do CSR dos bulbos de *A. cepa* expostos aos extratos aquosos das folhas foi de 30,97 (EAI) e 28,52 (EAD), observamos que houve diferença significativa entre elas, sendo a maior redução do CSR nos bulbos expostos ao EAD. Em relação ao CSR dos bulbos de *A. cepa* observou-se que as concentrações 0,002 e 0,004 (mg mL<sup>-1</sup>) do EAI estimularam o CSR, em relação ao controle negativo, enquanto as demais reduziram o CSR de *A. cepa* (Figura 2).



**Figura 2.** Crescimento do sistema radicular (CSR) dos bulbos de *Allium cepa* expostas aos extratos aquosos do tipo infuso (A) e decocto (B) das folhas de *Copaifera langsdorffii*. A linha tracejada representa a média do CSR do controle positivo.

Ao comparar o CSR dos bulbos de *A. cepa* no EAI e EAD para as diferentes partes da planta (Tabela 1), vemos que os extratos diferiram entre si para casca do caule e folhas. Nos extratos da casca do caule, houve uma maior diferenciação entre as médias, sendo as menores médias obtidas em ambos os extratos na concentração 0,016 (mg mL<sup>-1</sup>), demonstrando uma redução de 51,9% e 58,9%, no EAI e EAD respectivamente, em relação ao CSR do controle negativo, enquanto para os extratos das folhas, a concentração 0,032 (mg mL<sup>-1</sup>) apresentou as menores médias. Enfatizando o potencial tóxico de ambos os extratos aquosos de *C. langsdorffii* sobre o CSR dos bulbos de *A. cepa*, assim como Freitas *et al.* (2019) observaram avaliando a toxicidade e citotoxicidade de diferentes extratos das folhas de *Syzygium malaccense* sobre *Artemia salina* e *Allium cepa*, concluíram que os extratos aquosos podem apresentar maior toxicidade sobre os organismos teste.

**Tabela 1.** Crescimento do sistema radicular dos bulbos de *Allium cepa* exposto aos extratos tipo infuso e decocto da casca do caule e das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

Concentração	CSR (mm)	
	Caule	Folha
	Infuso	
0,000 mg mL <sup>-1</sup>	18,58B	33,76A
0.002 mg mL <sup>-1</sup>	13,02B	37,20A
0.004 mg mL <sup>-1</sup>	13,29B	34,45A
0.008 mg mL <sup>-1</sup>	10,17B	29,60A
0.016 mg mL <sup>-1</sup>	8,93B	26,92A
0.032 mg mL <sup>-1</sup>	9,58B	23,92A
Concentração	Decocto	
0,000 mg mL <sup>-1</sup>	18,58B	33,76A
0.002 mg mL <sup>-1</sup>	16,39B	33,00A
0.004 mg mL <sup>-1</sup>	12,16B	32,41A
0.008 mg mL <sup>-1</sup>	8,75B	27,45A
0.016 mg mL <sup>-1</sup>	7,62B	23,63A
0.032 mg mL <sup>-1</sup>	10,20B	20,87A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nas linhas dentro de cada extrato, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 5$ ).

### Efeito Citotóxico dos extratos aquosos de *Copaifera langsdorffii*

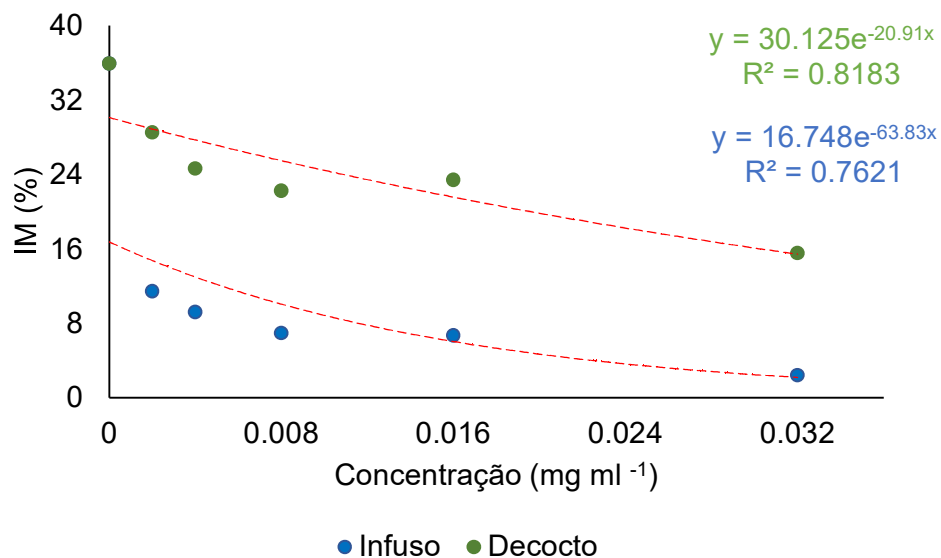
A análise de variância para o índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos extratos aquosos da casca do caule revelou que a diferença entre os extratos e entre as concentrações foi significativa, bem como a existência de interação entre extrato e concentração (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise de Variância (ANOVA) para o índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a extratos aquosos (infuso e decocto) da casca do caule de *Copaifera langsdorffii*.

Fonte de Variação	GL	QM
Extratos	1	1,0891**
Concentração	5	0,3269*
Extrato x concentração	5	0,0444**
Resíduo	108	0,0074
CV (%)		20,46
Média geral		0,4202

Nota: dados transformados em arco seno. \*Significativo a 5%, e \*\* a 1% de probabilidade pelo teste F. GL (Grau de Liberdade); QM (Quadrado Médio); CV (Coeficiente de Variação).

As médias do IM das células meristemáticas de *A. cepa*, observadas nas diferentes concentrações do EAI e EAD da casca do caule, diferiram entre o tipo de extrato aquoso e dentro dos extratos (Figura 3). Em ambos os extratos a maior concentração (0,032 mg mL<sup>-1</sup>), apresentou a menor média de IM, o que também foi observado por Reis *et al.* (2020) ao avaliar diferentes concentrações de *Stryphnodendron adstringens* sobre o ciclo celular de *A. cepa*, indicando correlação positiva entre o potencial citotóxico e o aumento da concentração.



**Figura 3.** Índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos extratos aquosos tipo infuso e decocto obtidos da casca do caule de *Copaifera langsdorffii*.

O número de células meristemáticas de *A. cepa* em intérfase variou entre 1.787 (0,002 mg mL<sup>-1</sup>) no EAD da casca do caule e 2.452 (0,032 mg mL<sup>-1</sup>) no EAD das folhas (Tabela 3). Demonstrando que no EAD das folhas ocorreu a maior redução de células em divisão. Nas células que apresentavam divisão, a fase prófase foi observada com maior frequência em relação as demais, sendo que a fase anáfase foi a menos observada na maioria dos tratamentos.

O número de células em divisão reduziu em todas as concentrações em relação ao CN do respectivo extrato, com exceção da concentração 0,002 mg ml<sup>-1</sup> do EAI das folhas, sendo que para casca do caule todas as concentrações do EAI e a concentração 0,032 mg mL<sup>-1</sup> do EAD apresentaram IM menor que o CP, evidenciando seu efeito citotóxico sobre a *A. cepa*. Por se tratar da parte da planta cujo acesso é mais fácil em relação as folhas, é necessário destacar a importância de estudos envolvendo análise *in vitro* para avaliar seu efeito sobre organismos animais.

Observa-se que com exceção da concentração 0,016 mg mL<sup>-1</sup> do EAD da casca do caule, o índice mitótico reduziu de acordo com o aumento da concentração para todos os extratos, assim como observado por Bezerra, Dinelly e Oliveira (2016) avaliando diferentes concentrações de extratos aquosos de *Plectranthus barbatus* sobre o ciclo celular de *A. cepa*.



**Tabela 3.** Número de células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes etapas do ciclo celular, submetidas a diferentes concentrações e extratos da casca do caule e folhas de *Copaifera langsdorffii*, bem como aos controles: negativos (CN) e positivos (CP).

Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Casca do caule					
	Infuso					
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
0.002	2214	208	21	23	34	11,44
0.004	2270	128	26	18	58	9,20
0.008	2326	121	11	10	32	6,96
0.016	2333	113	19	7	28	6,68
0.032	2440	34	5	8	13	2,40
CN	1601	812	33	20	34	35,96
CP	2080	404	7	5	4	16,80
Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Decocto					
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
	0.002	1787	642	17	21	33
0.004	1884	565	7	19	25	24,64
0.008	1944	514	7	15	20	22,24
0.016	1915	524	17	18	26	23,40
0.032	2111	380	4	3	2	15,56
CN	1601	812	33	20	34	35,96
CP	2080	404	7	5	4	16,80
Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Folhas					
	Infuso					
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
0.002	2256	144	24	19	57	9,76
0.004	2310	119	18	13	40	7,60
0.008	2325	97	22	14	42	7,00
0.016	2332	96	20	12	40	6,72
0.032	2390	77	12	4	17	4,40
CN	2257	169	24	11	39	9,72
CP	2465	24	4	2	5	1,40
Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Decocto					
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
	0.002	2349	100	13	15	23
0.004	2331	99	20	8	42	6,76
0.008	2391	63	17	12	17	4,36
0.016	2404	63	11	2	20	3,84
0.032	2452	45	1	0	2	1,92
CN	2257	169	24	11	39	9,72
CP	2465	24	4	2	5	1,40

IM: índice mitótico

A análise de variância do índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas a diferentes concentrações do EAI e EAD das folhas (Tabela 4) mostrou que os extratos e as concentrações foram significativos para o IM de *A. cepa*, porém não houve interação entre extratos e concentrações.

**Tabela 4.** Análise de Variância (ANOVA) para o Índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* expostos a extratos aquosos (infuso e decocto) das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

Fonte de Variação	GL	QM
Concentrações	5	0.05185*
Extratos	1	0.07409*
Concentração x Extrato	5	0.00527 <sup>ns</sup>
Resíduo	108	0.00379

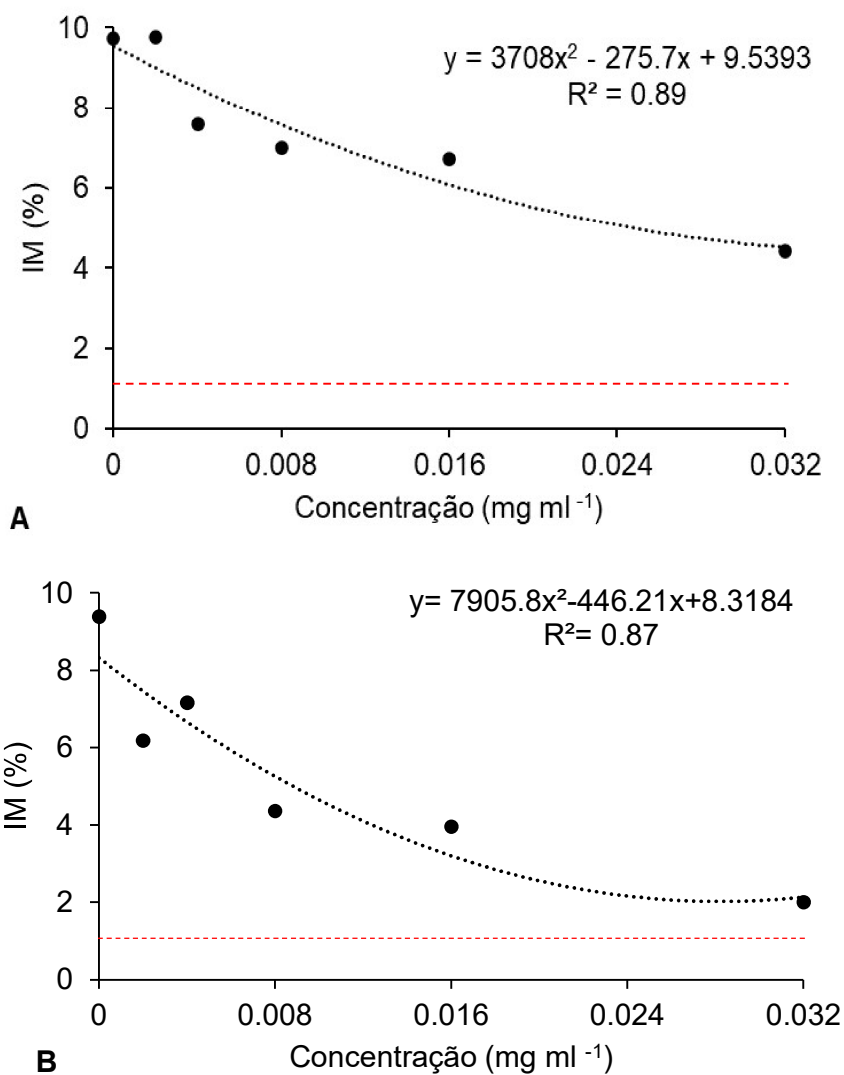
<sup>ns</sup> não significativo, \* significativo a 5% e \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. GL (Grau de Liberdade); QM (Quadrado Médio).

Quando avaliamos a média do IM das células meristemáticas de *A. cepa*, observamos que o EAD apresentou a maior redução, ficando com média do IM de 5,44%, assim como observado no IM das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas aos extratos da casca, Cardoso *et al.* (2018) também observaram IM menor no EAD em relação ao EAI, ao avaliar diferentes tipos de extrato de *Zingiber officinale* Roscoe sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Oliveira *et al.* (2016) avaliando diferentes técnicas de extração com a espécie *Dicksonia sellowiana*, destacaram a decocção como a técnica que apresentou maior eficiência na extração de teores totais e antioxidante, o que sugere relação entre o método de extração e os resultados obtidos neste estudo.

Com exceção da concentração 0,002 mg mL<sup>-1</sup> do EAI, todas as demais concentrações dos extratos obtidos por meio das folhas reduziram o IM das células meristemáticas de *A. cepa* (Figura 4), o que evidencia seu potencial citotóxico, assim como resultados encontrados por Silva *et al.* (2018) com diferentes concentrações de extratos aquosos das folhas e raízes de *Macroptilium lathyroides* sobre o ciclo celular de alface.

Quando comparamos o extrato infuso da casca e das folhas de *C. langsdorffii* não observamos diferenças significativas entre ambos, apenas entre as concentrações dos extratos aquosos das folhas com o CN. As médias do IM das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas ao EAD da casca do caule

(25,05%) e das folhas (5,44%) de *C. langsdorffii* diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $p < 5$ ).



**Figura 4.** Índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos extratos aquosos do tipo infuso (A) e decocto (B) das folhas de *Copaifera langsdorffii*. A linha tracejada representa a média do IM do controle positivo.

**Efeito Genotóxico dos extratos aquosos de *Copaifera langsdorffii***

As concentrações 0,002 mg mL<sup>-1</sup> do EAI da casca do caule, e 0,004 mg mL<sup>-1</sup> do EAD das folhas apresentaram respectivamente, 4,19% e 3,55% de aberrações celulares, próximo ao percentual do controle positivo das folhas, 5,71% de aberrações celulares (Tabela 5). Podemos observar que houve presença de aberrações na concentração usual para todos os extratos, sendo

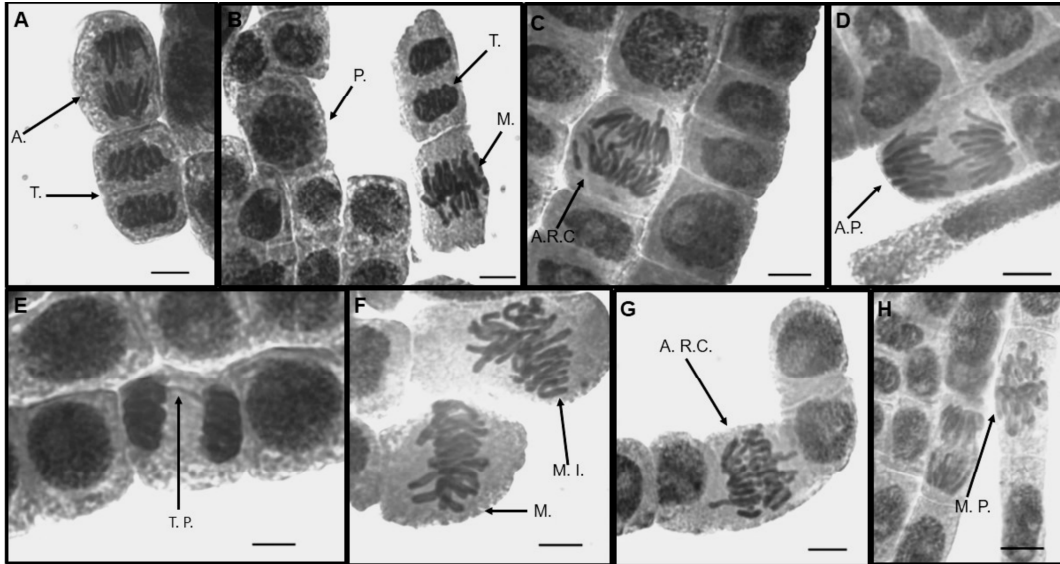
que o EAI da casca do caule apresentou a maior porcentagem de aberrações, e o EAI das folhas não apresentou aberrações em três das concentrações avaliadas.

**Tabela 5.** Partes da planta, extrato, concentrações, número de células observadas, número de células em divisão, número de aberrações celulares e frequência de aberrações celulares dos extratos da casca do caule e das folhas de *Copaifera langsdorffii* sobre as células meristemáticas das radículas de *Allium cepa*.

Parte da Planta	Extrato	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Nº de Células observadas	Nº de células em divisão	Total de células com aberrações	Aberrações celulares (%)
Casca	EAI	0.002	2500	286	12	4.19
		0.004	2500	230	2	0.86
		0.008	2500	174	5	2.87
		0.016	2500	167	1	0.60
		0.032	2500	60	2	3.33
	EAD	0.002	2500	713	2	0.28
		0.004	2500	616	5	0.81
		0.008	2500	556	2	0.36
		0.016	2500	585	4	0.68
		0.032	2500	389	1	0.26
Folhas	EAI	CN	2500	898	0	-
		CP	2500	420	2	0.47
		0.002	2500	244	1	0.41
		0.004	2500	190	0	-
		0.008	2500	175	3	1.71
	EAD	0.016	2500	168	0	-
		0.032	2500	110	0	-
		0.002	2500	151	1	0.66
		0.004	2500	169	3	3.55
		0.008	2500	102	1	1.96
		0.016	2500	96	3	3.12
		0.032	2500	48	0	-
		CN	2500	243	0	-
		CP	2500	35	2	5,71

CN - Controle negativo (água destilada); CP - Controle positivo (glifosato à 1%); EAI – Extrato aquoso infuso; EAD – Extrato aquoso decocto.

Durante a anáfase foi encontrada a maior parte das aberrações, sendo a anáfase com ponte a mais frequente. Na figura 5, podemos ver as aberrações celulares encontradas: anáfase com ruptura cromossômica, anáfase com ponte, metáfase irregular, metáfase poliploide e telófase com ponte.



**Figura 5.** Fases do ciclo celular observadas em células do meristema radicular de *Allium cepa* em diferentes concentrações de extratos aquosos de *Copaifera langsdorffii*. Anáfase e telófase (A), Prófase, telófase e metáfase (B), Anáfase com ruptura cromossômica (C), Anáfase com ponte (D), Telófase com ponte (E), Metáfase e metáfase irregular (F), Anáfase com ruptura cromossômica (G) e Metáfase poliploide (H). P = prófase; M = metáfase; M.I. = metáfase irregular; M.P. = metáfase poliploide; A = anáfase; A.P. = anáfase com ponte; A.R.C. = anáfase com ruptura cromossômica; T = telófase e T.P. = telófase com ponte; Barra = 10  $\mu$ m.

## **Conclusões**

Os resultados evidenciam o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico dos extratos aquosos de *Copaifera langsdorffii* sobre o organismo teste. Os extratos aquosos do tipo decocto das folhas e da casca do caule de copaífera demonstraram maior ação tóxica que os do tipo infuso. Os maiores efeitos citotóxicos e genotóxicos foram observados no extrato aquoso infuso da casca do caule da *C. langsdorffii*, que apresentou os menores valores de IM e maior percentual de alterações na divisão celular para todas as concentrações.

O extrato que causou menos alterações nos valores de IM, bem como menor presença de alterações na divisão celular foi o extrato aquoso tipo infuso das folhas, portanto, o mais recomendado para utilização com fins fitoterápicos, pois traria menor prejuízo a saúde.

## Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F.K.V. de *et al.* Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lecheri*). **Revista Fitos**, v. 13, n. 1, p. 29-37, 2019. DOI: <https://doi.org/10.17648/2446-4775.2019.605>.

AZEVEDO, F.R. de *et al.* Larvicidal Activity of Native Plant Extracts From the Araripe National Forest on *Aedes aegypti*. **Journal of agricultural Science**, v. 11, n. 7, p.105-114, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v11n7p105>.

BABICH, H.; SEGAL, M.A.; FOX, K.D. The *Allium* test - a simple, eukaryote genotoxicity assay. **American Biology Teacher**, v. 59, n. 9, p. 580–583, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2307/4450386>.

BELCAVELLO, L. *et al* 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. Disponível em: [http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/08\\_BelcavelloLetal\\_140145.pdf](http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/08_BelcavelloLetal_140145.pdf). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

BEZERRA, C.M.; DINELLY, C.M.N.; 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*. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 13, n. 3, p. 220-228, 2016. Disponível em: [http://revistas.ufg.br/index.php/REF/index\\_](http://revistas.ufg.br/index.php/REF/index_) Acesso em: 14 de outubro de 2020.

BOUBLI, J.P.; HRBEK, T. Introdução à biodiversidade Amazônica. *In*: MARCON, J.L. *et al.* **Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação**. Editora da Universidade Federal do Amazonas EDUA, Manaus, dezembro de p.11-17, 2012.

BRANCALION, A.P.S. *et al.* Efeito do extrato hidroalcolólico de folhas de *Copaifera langsdorffii* na urolitíase induzida em ratos. **Urological Research**, v. 40, p. 475-481, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007 / s00240-011-0453-z>

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 148p, 2006. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf). Acesso em: 14 de outubro de 2020.

CAMPOS, S. C. *et al.* Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n.1, supl. I, p. 373-382, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_057](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_057)

CARDOSO, E. dos S. *et al.* Avaliação do potencial citogenotóxico de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre), *Zingiberaceae*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [S.l.], v. 24, n. 1, 2018. Disponível em:

<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/776/359>. Acesso em: 20 de junho de 2020.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras; recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Curitiba: EMRAPA/CNPF; Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640p. Disponível em: [https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index\\_especies.htm](https://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/temp/index_especies.htm). Acesso em: 20 de junho de 2020.

COSTA, J.F.V da; ALVES, N.S.M. Os recursos estratégicos da Amazônia brasileira e a cobiça internacional. **Revista perspectiva**, v.11, n.20, p.65-86, 2018.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.

FRANCO, D.M. *et al.* Variação sazonal no potencial alelopático das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Acta Botanica Brasileira**, v. 30, n. 2, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0296>

FREITAS, V.M. de. *et al.* Avaliação da atividade tóxica e citotóxica de extratos da planta *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2019. DOI: <http://orcid.org/0000-0001-5183-9007>

GUEDES, C.M. *et al.* Cytotoxic and genotoxic potential of *Ginkgo biloba* L., in industrialized and without-additive forms. **Biosciense jornal**, v.34, n.4, p. 1017-1024, 2018.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191p.

HISTER, C.A.L. *et al.* Atividade antiproliferativa e determinação de compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 43-48, 2017. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3811>. Acesso em: 02 de outubro de 2020.

LISBOA, A.J.M. *et al.* Análises fitoquímicas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Científica Sena Aires**, v. 7, n. 3, p. 208-213, 2018. Disponível em: <http://revistafacesa.senaaires.com.br/index.php/revisa/article/view/322>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.



- LOURENÇO, A.C.S. *et al.* Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embrionário fetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 407-413, 2009.
- MERCADO, S.A.S.; CALEÑO, J.D.Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134452-134459, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>
- MESSIAS, M.C.T.B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_139](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_139)
- MOROSINI, R. R. In: ANAIS: 3ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNEMAT Avaliação citotóxica de extratos aquosos de *Tabebuia avellanedae* Lorentz exGriseb (Ipê-rosa). Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, MT, Brasil, p. 20-24, 2008.
- OLIVEIRA, V.B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausura de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016. DOI: [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_106](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_106).
- PIRES, N. D. M. *et al.* 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000100007>.
- PORTIS, I.G. *et al.* Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *Chochlospermum regium*. **Revista eletrônica da faculdade evangélica de Ceres**, v. 5, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.36607/refacer.v5i1.3357>
- REIS, H.S. dos. *et al.* Absence of cytotoxic and genotoxic effects of the aqueous extract of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) bark using *Allium cepa* test. **Biota Amazônica**, v. 10, n. 1, p. 20-233, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n1p20-23>
- RIBEIRO, T.P. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 245-249, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.20114>
- RIGMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O. **Copaíba: Ecologia e Produção de Óleo-Resina**. EMBRAPA, Rio Branco-AC, outubro, 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/501674/copaiba-ecologia-e-producao-de-oleo-resina>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

CAMPINAS. Plantas medicinais: cartilha. Prefeitura municipal de Campinas, SP. Campinas- SP, 1ª edição, 2ª reimpressão, 52p, 2018.

SANTOS, F.S.D. dos. Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v.6, p. 919-939, 2000.

SENIGALIA, R.L.C. *et al.* Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n8-088>

SILVA, M.S.A. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of *Macroptilium lathyroides*. **Planta daninha**, 2018, v. 36, p.1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582018360100043>.

SOUZA, S. A. M. *et al.* Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050101>. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

VASCONCELOS, J.; VIERA, J.G. de P.; VIEIRA, E.P. de P. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2009. Disponível em: <http://www.gege.agrarias.ufpr.br/plantastoxicass/textos/euphorbia%20mili.pdf>. Acesso em: 02 de outubro de 2020.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Os indivíduos de *Copaifera langsdorffii* possuem alta diversidade genética entre si, potencial para compor programas que visem a preservação da espécie e capacidade de integrar bancos de germoplasma. Avaliar a coancestralidade de indivíduos jovens e mudas de *C. langsdorffii* pode permitir conhecer melhor o fluxo gênico da espécie.

A avaliação por meio do teste *A. cepa* evidenciou o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico da espécie. O extrato aquoso da casca do caule é o menos indicado para fins fitoterápicos, mesmo em concentrações inferiores a usual, e o extrato aquoso infuso das folhas demonstrou menor influência sobre as alterações no organismo teste, indicando ser potencialmente menos prejudicial à saúde humana e o que recomendamos.