



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS  
JENIFER FERNANDA DAMASIO



**Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria  
ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso, Brasil.**

ALTA FLORESTA  
MATO GROSSO – BRASIL  
DEZEMBRO – 2016

JENIFER FERNANDA DAMASIO

**Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria  
ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso, Brasil.**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado De Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isane Vera Karsburg

ALTA FLORESTA  
MATO GROSSO – BRASIL  
DEZEMBRO – 2016

Damasio, Jenifer Fernanda

Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso. Jenifer Fernanda Damasio. Alta Floresta/MT: UNEMAT, 2016.

95 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, 2016.

Orientadora: Isane Vera Karsburg

1. Poaia. 2. Citogenética. 3. Poaia - efeito antiproliferativo. 4. Genotoxicidade – poaia. I. Título.

CDU: 582.972(817.2)

Ficha catalográfica elaborada por Tereza Antônia Longo Job CRB1-1252

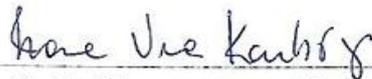
**Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria  
ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso, Brasil.**

**JENIFER FERNANDA DAMASIO**

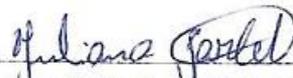
Dissertação apresentada à Universidade do Estado De Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isane Vera Karsburg

Aprovado em 20 de dezembro de 2016.

Comissão Examinadora:



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Isane Vera Karsburg  
Orientadora - PGMP-UNEMAT



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliana Garlet  
Depto Engenharia Florestal- UNEMAT- Alta Floresta



Prof. Dr. Marcelo Fernando Pereira Souza  
SECITECI- Escola Técnica de Alta Floresta -MT

*“A minha filha Lavínia e ao meu esposo Marcio José Gonçalves Dias”  
Vocês abraçaram meus sonhos como se eles fossem seus e me deram  
coragem para continuar voando até alcançar aquela linda estrela cadente.*

*É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver*

*Martin Luther King*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, pela vida que me concedeu, pelas conquistas que me deu, pelas pessoas que colocou no meu caminho e por me guiar durante mais essa jornada e muitas outras que estão por vir!

Com todo o meu amor agradeço imensamente minha família que sempre me apoiou em cada passo dessa caminhada, com imenso amor, me ajudou a alcançar cada degrau.

Obrigada meu amado marido, Marcio Dias por me apoiar e incentivar, demonstrar que sempre há luz no fim do túnel e que só com muito esforço e dedicação se pode alcançá-la.

À Minha mochilinha, F1, o melhor de mim, Lavínia, por estar sempre a meu lado e me incentivando com apenas o olhar e o sorriso que fornece a cada amanhecer.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isane Vera Karsburg, pela orientação e dedicação que me concedeu durante esse período da minha formação, pelos conselhos dados, pela amizade e disponibilidade em seu tempo, um exemplo de mulher, mãe e professora, jamais irei deixar de lembrar a pessoa grandiosa que é, um exemplo a ser seguido como pessoa e profissional. A você o meu muito obrigado!

A Universidade do Estado de Mato Grosso, pela estrutura e oportunidade concedida para a realização dessa pesquisa e obtenção deste título.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos Professores que fizeram parte de cada conhecimento adquirido durante o mestrado, que irei carregar por toda a minha vida pessoal e profissional.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliana Galerte o Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Marcelo Fernando Pereira de Souza pela disponibilidade e contribuição na banca.

Aos meus colegas de turma por estarem nesta etapa da minha vida, agradeço cada momento juntos, tanto de desespero como também de muitas risadas, e a cada momento de aprendizado.

Aos companheiros do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetal, aos colegas Bruna, Vanessa, Weslaine, Lindisai, Lorena, Douglas, Maialu

por toda ajuda e apoio, cada um que com sua paciência colaborou com essa pesquisa.

Ao Doutorando Ricardo Gallo, pela sua disponibilidade e por colaborar com essa pesquisa.

Agradeço a todos os técnicos de Laboratório em especial Ligia e Nina e aos funcionários do *Campus* de Alta Floresta - MT que mantém todo o ambiente limpo e organizado para que pudéssemos realizar essa e outras pesquisas. Sem vocês o trabalho se tornaria mais cansativo.

A CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Meu imenso obrigado a todos!

## BIOGRAFIA

Jenifer Fernanda Damasio, filha de Marcia Damasio, sendo criada pelos avós maternos, Manoel Damasio e Eva Damasio, nasceu dia 21 de julho de 1990, em Mundo Novo, Mato Grosso do Sul, Brasil. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual José Juarez Ribeiro de Oliveira- Extensão Santa Rosa, na cidade de Itaquirai, Mato Grosso do Sul, em 2007. O grau de Licenciatura em Ciências Biológicas foi conferido em dezembro de 2011, pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) *Campus* Universitário de Mundo Novo- MS. Foi bolsista de Iniciação Científica por 12 meses pelo projeto de Pesquisa intitulado “Análise Citogenética em pequenos peixes da ordem Siluriformes da bacia do Rio Iguatemi, Mundo Novo, Brasil”. Iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNEMAT *campus* de Alta Floresta- MT, em Fevereiro de 2015 e em Dezembro de 2016 submeteu-se à defesa de dissertação, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isane Vera Karsburg.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1 O gênero <i>Psychotria</i> L.....	2
2.2 <i>Psychotria ipecacuanha</i> .....	3
2.3 Citogenética no gênero <i>Psychotria</i> e em <i>P. ipecacuanha</i> .....	4
2.4 Viabilidade Polínica .....	6
2.5 Considerações sobre Citotoxicidade .....	7
2.6 Considerações sobre Genotoxicidade.....	8
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>8</b>
<b>4. CAPÍTULOS</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA, DETECÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEOLO E BANDEAMENTO C EM <i>Psychotria ipecacuanha</i>, MATO GROSSO, BRASIL</b> .....	<b>16</b>
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
INTRODUÇÃO .....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
CONCLUSÃO .....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
<b>4.2 ÍNDICE MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Psychotria ipecacuanha</i> LOCALIZADA EM TANGARÁ DA SERRA, MATO GROSSO, BRASIL</b> .....	<b>30</b>
RESUMO .....	30
ABSTRACT .....	31
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÃO .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
<b>4.3 GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DAS RAÍZES DE <i>Psychotria ipecacuanha</i></b> .....	<b>46</b>
RESUMO .....	46
ABSTRACT .....	47
INTRODUÇÃO .....	48

MATERIAL E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
<b>4.4 EFEITO GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE <i>Psychotria ipecacuanha</i> (RUBIAEAE) SOBRE O CICLO CELULAR DE <i>Allium cepa</i> L E <i>Pisum sativum</i> .....</b>	<b>71</b>
RESUMO .....	71
ABSTRACT .....	72
INTRODUÇÃO .....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
CONCLUSÃO .....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>91</b>

## RESUMO

DAMASIO, Jenifer Fernanda, Msc., Universidade do Estado de Mato Grosso, Dezembro de 2016, Análise citogenética, genotóxica e citotóxica de *Psychotria ipecacuanha* em populações do estado do Mato Grosso, Brasil. Orientadora: Isane Vera Karsburg.

*Psychotria ipecacuanha* é uma planta herbácea, perene, conhecida popularmente por ipeca ou poaia. Dados citogenéticos fornecem informações sobre a caracterização genética das espécies, tornando-se um importante instrumento para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo estimar a viabilidade polínica de *Psychotria ipecacuanha*, por meio de distintos métodos colorímetros, bem como avaliar os efeitos antiproliferativos e genotóxicos das decocções de raízes e folhas por meio do teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum* e realizar uma caracterização citogenética. Para análise citogenética foram retiradas radículas que foram submetidas a bloqueio com APM, na concentração de 3 $\mu$ M, em um período de 18 horas à 4°C e fixadas e estocadas à -5°C. A digestão foi realizada com 200 $\mu$ L de enzima pectinase, levadas em banho-maria por 2 horas em 35°C, posteriormente fixadas e refrigeradas por 24 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular do meristema radicular e secadas ao ar em movimentos rápidos, coradas com Giemsa 5% por 3 minutos. Algumas lâminas de citogenética foram submetidas ao bandeamento Ag-NOR e C. Na estimativa da viabilidade polínica foram testados os corantes: lugol 2%, Azul de Astra 0,5%, Reativo de Alexander e TTC 0,30%. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento. Analisaram-se 300 grãos de pólen por lâmina. Na análise da genotoxicidade e efeito antiproliferativo das decocções das folhas e raízes, foram testados nas concentrações de 2g/L, 5g/L, 8g/L, nos tempos de exposição de 24, 48, 72, 96, 120h, sendo as lâminas preparadas pelo método de esmagamento. A partir das análises citogenéticas concluiu-se que *P. ipecacuanha*, possui um complemento diploide de 22 cromossomos, com uma fórmula cariotípica de 7M+4SM, possui um par de RONS ativas localizadas na porção telomérica do par de cromossomos 4, e dois pares de cromossomos com blocos heterocômicos. A população de *P. ipecacuanha* apresentou um alto índice meiótico, com valores acima de 85%, o que indica a ocorrência de uma meiose regular, e independente do corante utilizado, a taxa média percentual de viabilidade polínica foi alta, mesmo havendo diferença

significativa entre os corantes utilizados, e por corar apenas pólenes com atividade respiratória indica-se o TTC 0,30%. Análise da genotoxicidade e efeito antiproliferativo, feita por meio do teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum*, revelou que tanto as decocções das raízes quanto a das folhas possuem efeito genotóxico, uma vez que todas as concentrações causaram alterações cromossômicas, e um alto poder antiproliferativo e citotóxico, produzindo um efeito inibitório no ciclo celular dos dois bioindicadores testados.

**Palavras-chave:** poaia, citogenética, genotoxicidade, efeito antiproliferativo.

## ABSTRACT

DAMASIO, Jenifer Fernanda, MSc., State University Mato Grosso, December 2016, Cytogenetic, genotoxic and cytotoxic analysis of *Psychotria ipecacuanha* in populations of the State of Mato Grosso, Brazil. Advisor: Isane Vera Karsburg.

*Psychotria ipecacuanha* is a herbaceous, perennial plant, popularly known as ipeca or poaia. Cytogenetic data provide information on the genetic characterization of the species, becoming an important instrument for understanding kinship relations and evolution mechanisms. The objective of this study was to estimate the pollen viability of *Psychotria ipecacuanha* by means of different colorimetric methods, as well as to evaluate the antiproliferative and genotoxic effects of roots and leaves decoctions by means of the *Allium cepa* and *Pisum sativum* test and to perform a cytogenetic characterization. For cytogenetic analysis, radicles were removed and subjected to blocking with APM at a concentration of 3 $\mu$ M in a period of 18 hours at 4°C and fixed and stored at -5 ° C. The digestion was carried out with 200  $\mu$ L of pectinase enzyme, washed in a water bath for 2 hours at 35 ° C, then fixed and refrigerated for 24 hours. The blades were prepared by the cellular dissociation technique of the root meristem and air dried in rapid movements, stained with Giemsa 5% for 3 minutes. A few cytogenetic blade were submitted to the Ag-NOR and C banding. In the estimation of pollen viability, the dyes were tested: Lugol 2%, Astra Blue 0,5%, Reactive of Alexander and TTC 0,3%. The blades were prepared by the crushing method. 300 grains of pollen per leaf were analyzed. In the analysis of the genotoxicity and antiproliferative effect of leaf and root decoctions, they were tested at concentrations of 2g/L, 5g/L, 8g/L, at exposure times of 24, 48, 72, 96, 120h, and the blades were prepared by the crushing method. From the cytogenetic analysis it was concluded that *P. ipecacuanha* has a diploid complement of 22 chromosomes, with a karyotype formula of 7M + 4SM, has a pair of active RONS located in the telomeric portion of the pair of chromosomes 4, and two pairs of chromosomes with heterochromic blocks. The population of *P. ipecacuanha* presented a high meiotic index, with values above 85%, which indicates the occurrence of a regular meiosis, and independent of the dye used, the average percentage rate of pollen viability was high, even though there was a significant difference between the dyes used, and for blushing only pollens with respiratory activity indicates the TTC 0.30%. Analysis of the genotoxicity and antiproliferative effect, analyzed by the test of *Allium cepa* and *Pisum sativum*, showed that both root and leaf decoctions have a genotoxic effect, since all

concentrations caused chromosomal alterations, and a high antiproliferative and cytotoxic, producing an inhibitory effect on the cell cycle of the two bioindicators tested.

**Key words:** poaia, cytogenetics, genotoxicity, antiproliferative effect.

## 1.INTRODUÇÃO GERAL

Rubiaceae Juss é uma das maiores famílias de angiospermas, com aproximadamente 637 gêneros e 10.700 espécies, apresenta distribuição cosmopolita, com maior diversidade nos trópicos e subtropicais (Heywood et al., 2007; Paiva et al., 2009). Possui espécies com importância ornamental (*Mussaenda* spp., *Ixora* spp., *Gardenia* spp., dentre outras), alimentícia (*Genipa americana* L e *Coffea arabica* L) e medicinal, como é o caso de *Psychotria ipecacuanha*, produtora de emetina e cefalina que conferem à planta um poder emético e amebicida (Gomes et al., 2009; Martins et al., 2009).

Do ponto de vista citogenético, são poucas as informações sobre as espécies medicinais, em especial as neotropicais (Silva et al., 2004). Avaliações citológicas podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e mesmo de trabalhos de melhoramento, visto que muitas das espécies que resultam em medicamentos modernos e tradicionais estão ameaçadas de extinção (Mello, 2004; Auler et al., 2002).

Dados citogenéticos fornecem informações sobre a caracterização genética das espécies, o que torna um importante instrumento para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução, tanto dentro de pequenos táxons quanto em níveis superiores (Vieira, 2013).

A análise cariotípica, envolvendo dados como número, tamanho e morfologia dos cromossomos, presença de constrição secundária ou satélites, relação entre braços, podem fornecer informações valiosas na comparação entre táxons ou até mesmo dentro de um mesmo táxon, sendo estes dados utilizados muitas vezes taxonomicamente para diferenciar espécies com características morfológicas próximas ou iguais (Stebbins, 1971; Guerra, 1988).

A estimativa da viabilidade polínica fornece dados importantes sobre o fluxo gênico em plantas, uma vez que evidencia o potencial de reprodução masculina da espécie, podendo ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (Frescura et al., 2012). Uma das técnicas que permite conhecer a taxa de viabilidade do pólen são os métodos colorimétricos, que distinguem os pólenes férteis (viáveis) dos estéreis (inviáveis) (Martins et al., 2012, Dafni, 1992).

Estudos de toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade são necessários por contribuírem para a utilização segura e eficaz das plantas medicinais. O uso de bioindicadores é uma alternativa rápida e segura para obtenção de dados sobre a citotoxicidade e genotoxicidade de extratos vegetais, um exemplo é o teste com *Allium cepa*, o qual fornece dados sobre toxicidade, a partir de parâmetros macroscópicos que se baseiam em formação de tumores, raízes torcidas e avaliação de crescimento de raízes, e de parâmetros microscópicos, como os índices mitóticos, taxa de divisões celulares e aparecimento de aberrações cromossômicas (Cuchiara et al., 2012).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo estimar a viabilidade polínica da espécie medicinal, *Psychotria ipecacuanha*, por meio de distintos métodos colorimétricos, bem como avaliar os efeitos genotóxicos e antiproliferativos das decocções de raízes e folhas por meio do teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum* e realizar uma caracterização citológica, a partir da análise da morfometria cromossômica, bandeamento Ag-NOR e C.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Psychotria* L.

*Psychotria* L. é o maior gênero da tribo Psychotrieae e da família Rubiaceae, compreendendo aproximadamente 2.000 espécies de distribuição pantropical e subtropical, representado por arbustos, pequenas árvores, ervas e raramente por epífitas, comum no sub-bosque de matas tropicais (Taylor 1996; Hamilton 1989; Davis et al., 2001).

O gênero é amplamente reconhecido por ter alta complexidade taxonômica podendo ser atribuído ao grande número de espécies presentes no gênero, e pela falta de características morfológicas disponíveis para delimitar os grupos, sendo que muitas características encontradas em *Psychotria* são compartilhadas com espécies de outros gêneros, como *Palicourea* e *Cephaelis* (Delprete, 2012).

As espécies de *Psychotria* são ricas em metabólitos secundários, dos quais já foram isolados e identificados: alcaloides (60%), seguido por triterpenos (9%), ciclotídeos (5%), flavonoides (4%), cumarinas (3%), norisoprenoides (3%), quinonas (3%), esteroides (3%) e outras classes (10%) (Klein-Junior et al., 2014; Teixeira et

al., 2012). Tais compostos conferem as espécies, um poder medicinal que é explorado pela população como fonte de medicamentos.

Várias espécies do gênero são utilizadas na medicina popular, como exemplo de *Psychotria carthaginensis* (Jacq.) e *Psychotria viridis* (Ruíz & Pavón), que são usadas como emético, antiparasitária, e alucinógeno; *Psychotria ipecacuanha*, auxilia no tratamento de bronquite, irritações da pele e distúrbios gastrointestinais; *Psychotria insularum* (Müll. Arg) no tratamento de desordem abdominal, cataratas e infecções; *Psychotria colorata* (Willd. ex Roem. Schult.) suas flores são utilizadas pela população amazonense, para dores e infecções de ouvido e as raízes para o tratamento de dores abdominais (Gerlach et al., 2010; Verotta et al., 1998; Oliveira et al., 2013).

Na literatura, são descritas várias atividades para extratos e alcaloides isolados das espécies de *Psychotria*, entre as quais estão: antimicrobiana e analgésica, e ainda revelam que algumas espécies do gênero apresentam alta atividade citotóxica, inibição da agregação plaquetária, efeitos antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos, e atividade antioxidante e antimutagênica (Benevides et al., 2004; Both et al., 2005; Fragoso et al., 2008).

Estudos realizados por Adjibadé et al. (1990) em *Psychotria forsteriana* demonstraram uma atividade citotóxica em linhagens de células de hepatoma de ratos e células leucêmicas humanas. Já Frescura et al. (2012) ao estudar os extratos de *Psychotria brachypoda* e *Psychotria birotula* constataram uma inibição no crescimento radicular, do índice de velocidade de germinação, além de detectar efeito antiproliferativo e induzir alterações cromossômicas em *Eruca sativa*, concluindo que as espécies estudadas apresentaram efeitos alelopáticos, genotóxicos e antiproliferativos sobre *Eruca sativa* em ambas as concentrações estudadas. Lubini et al. (2008), ao avaliarem os efeitos dos extratos de *Psychotria myriantha* e *Psychotria leiocarpa*, sobre o ciclo celular de *A. cepa*, concluíram que tais espécies apresentaram potencial antiproliferativo.

## **2.2 *Psychotria ipecacuanha***

*Psychotria ipecacuanha* é conhecida popularmente por poaia-verdadeira, poaia-legítima, ipeca, ipeca-do-mato-grosso, ipeca-do-rio, cipó-emético e raiz-preta.

É utilizada como planta medicinal, cujo uso farmacológico está ligado a produção de dois alcaloides em suas raízes: a emetina utilizada no combate a disenteria amebiana, além de possuir propriedades, expectorante, adstringente e anti-inflamatória, e a cefalina que possui atividade emética, resultante da excitação provocada no esôfago e estômago e, transmitida ao bulbo, provocando o vômito. Em concentração reduzida, aplica-se como expectorante nas bronquites e asma, para facilitar a eliminação das mucosidades dos brônquios, purgativo e tônico (Silva et al., 2015).

*P. ipecacuanha* é uma planta herbácea, perene, que pode variar de 20 cm a 60 cm. Suas folhas são lisas e persistentes na parte superior dos ramos, variando desde elípticas até ovais, oblongo-lanceoladas. As flores são hermafroditas, sésseis, pequenas e brancas, aglomeradas em uma inflorescência que depois de fecundadas dão origem a um cacho de frutos vermelhos. A raiz apresenta anéis salientes que a diferencia de outras plantas (Silva et al., 2015; Assis e Giulietti, 1999).

A poaia ocorre em sub-bosques de florestas com precipitação anual em torno de 2000 mm, temperatura média em torno de 25°C e umidade relativa do ar média de 80%, se restringindo a três regiões distintas: nos países da América Central, Norte da América do Sul (Colômbia), no sul da Amazônia brasileira (estados de Mato Grosso e Rondônia) e na Mata Atlântica (principalmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia) (Teixeira et al., 2012).

Segundo Lameira (2002), *P. ipecacuanha* é uma espécie ameaçada de erosão genética ou em vias de extinção por ter sofrido intenso processo extrativo nos dois séculos passados, abertura de novas fronteiras agrícolas e, também, por ter as áreas de ocorrência natural reduzidas. Oliveira e Martins (1998) também constataram que as populações naturais de *P. ipecacuanha* vêm reduzindo drasticamente em consequência do intenso extrativismo, do elevado valor medicinal e comercial das raízes e do desmatamento.

### **2.3 Citogenética no gênero *Psychotria* e em *P. ipecacuanha***

O gênero *Psychotria* é um dos maiores dentro da subfamília Rubioideae, apresentando grande diversidade morfológica de seus caracteres, com pouca

disponibilidade de relatos de dados cromossômicos para suas espécies, especialmente para as espécies tropicais e subtropicais (Kiehn, 1986).

Kiehn (1986), Assis e Giulietti, 1999, Rossi et al. (2008) relatam que o número básico do gênero é  $x = 11$ . Dados da literatura relatam números cromossômico variando desde  $2n = 22$  ( $n = 11$ ) em inúmeras espécies, como em *Psychotria bisulcata*, *Psychotria ipecacuanha* e *Psychotria hoffmannseggiana* até números relativamente altos, como  $2n = 132$  em *Psychotria mahonii* C.H. Wright (Kiehn, 1986). Além das diferenças nos números cromossômicos, observa-se grande variação em relação ao tamanho dos cromossomos e também na fórmula cariotípica de suas espécies.

Corrêa (2010) em estudos com 11 espécies do gênero, observou que os números cromossômicos variaram de  $2n = 22$ , em cinco espécies (*P. lupulina* Benth., *P. hoffmannseggiana* Müll. Arg., *P. marginata* Sw., *P. tenerior* (Cham.) M. Arg. e *P. trichophora* Müll. Arg.),  $2n = 40$  em *P. mapourioides* DC., a  $2n = 44$  em outras cinco espécies (*P. gracilentia* M. Arg., *P. carthagenensis* Jacq., *P. sessilis* (Vell.) M. Arg., *P. vellosiana* Benth e *P. suterella* M. Arg.). Constatou também uma grande variação no tamanho dos cromossomos (5,59 a 0,90  $\mu\text{m}$ ) e na fórmula cariotípica, a análise dos cariótipos demonstraram uma predominância de cromossomos metacêntricos e uma taxa de simetria que variou de (TF% = 38,83) a altamente simétrica (TF% = 50,00).

Dentro do gênero ocorre a prevalência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Correa e Forni-Martins (2004) apresentaram o ideograma de *P. deflexa* DC. ( $2n = 32$ ), encontrando cromossomos muito grandes (7,33-2,77  $\mu\text{m}$ ), sendo na maioria submetacêntricos levando um ideograma com taxa de simetria de TF%=40,06.

Dados encontrados na literatura relatam um número cromossômico para *Psychotria ipecacuanha* de  $2n=22$  cromossomos, tal resultado foi constatado por Assis e Giulietti (1999) e Souza et al. (2006) em estudos com células meióticas. Rout et al. (2000) também descreveram o mesmo número cromossômico a partir de células do meristema apical de raiz de embriões somáticos. Posteriormente Rossi et al. (2008), utilizando a técnica de dissociação celular confirmou o número cromossômico da espécie, obtendo cromossomos com comprimentos variando de 3,97 a 2,53  $\mu\text{m}$  e com quatro cromossomos metacêntricos (4, 5, 8 e 9) e sete

submetacêntricos (1, 2, 3, 6, 7, 10 e 11). No entanto não foram encontrados estudos de bandeamentos cromossômicos, com a impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) e bandeamento C.

## **2.4 Viabilidade polínica**

Estudos sobre o pólen e sua viabilidade servem de base para conhecer a biologia reprodutiva, além de ser um fator importante para o melhoramento, cultivo e conservação de plantas, já que em muitas espécies, como as alógamas, o fluxo gênico por meio do pólen aumenta a possibilidade de formação de diferentes combinações entre alelos, e conseqüentemente da variabilidade genética (Serejo et al., 2012; Auler et al., 2002). Alta viabilidade polínica é um fator primário para que o pólen venha a ter oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo um estágio decisivo à fertilização.

Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas na formação do zigoto, quanto maior a taxa de viabilidade e germinabilidade polínica, maior a possibilidade da produção de combinações distintas entre alelos e, em última análise, de variabilidade genética (Akoroda, 1983).

A viabilidade polínica pode ser testada por meio de vários métodos, os quais podem ser agrupados em métodos diretos: germinação *in vitro*, germinação *in vivo*, porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste e por métodos indiretos: baseados em parâmetros citológicos como a coloração (Pio et al., 2007; Ferreira et al., 2007; Kearns e Inouye, 1993).

Na tentativa de se obter dados mais confiáveis na determinação da viabilidade polínica, utiliza-se a avaliação comparativa entre corantes. Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o lugol, sudan IV, carmim acético, Reativo de Alexander, azul de anilina, iodeto de potássio, azul de algodão, e 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio, os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen fornecendo resultados com baixo custo e de forma rápida (Sharma e Sharma, 1994; Shivanna e Rangaswamy, 1992).

Dados na literatura demonstram que espécies do gênero *Psychotria* L. possuem uma alta viabilidade polínica. Teixeira e Machado (2004), em estudos com

*Psychotria barbiflora* DC, observaram que a viabilidade polínica das flores brevistilas e longistilas foi alta, em torno de 97 e 98%. Resultados semelhantes foram encontrados por Koch et al. (2010), na avaliação de dois tipos de morfos de *Psychotria carthagenensis*. A alta viabilidade encontrada em espécies de *Psychotria* L é uma característica comum em espécies heterostílicas, como os resultados encontrados em: *P. sessilis*, *P.conjugens* e *P. hastisepla* (Silva 2007), *P. poeppigiana* (Coelho e Barbosa, 2004), *P. barbiflora* (Teixeira e Machado 2004).

## **2.5 Considerações sobre Citotoxicidade**

Algumas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo a divisão celular. Estes metabolitos muitas vezes apresentam efeito genotóxicos e mutagênicos que são também utilizados na medicina popular na cura de doenças, onde a preparação e uso adequado trazem benefícios, porém seus efeitos necessitam de melhores investigações (Nunes e Araújo, 2003; Iganci et al., 2006).

O nível de citotoxicidade de extratos vegetais pode ser aferido pela avaliação de possíveis alterações no índice mitótico ou irregularidades durante o ciclo celular. Este parâmetro consiste em avaliar a presença e a frequência da divisão celular, o que pode ser correlacionado com o padrão de desenvolvimento da raiz, já que a redução da taxa de crescimento da raiz pode ser resultado da inibição da divisão celular, o que também acarreta em um decréscimo no índice mitótico (Marcano et al., 2004; Liu e Jiang, 1992). O aumento ou a redução do grau de índices mitóticos é um importante indicador para monitorar os efeitos de extratos vegetais, especialmente aqueles com potencial citotóxico (Caritá et al., 2010).

O método de avaliar alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é reconhecido e registrado pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) como sendo um teste muito eficiente para fazer monitoramentos e análise *in situ* da citotoxicidade de extratos vegetais. Isso se deve às características cromossômicas que são favoráveis, além de fatores como germinação, por ser um método rápido, simples e barato (Rank e Nielsen, 1994; Leme e Marin-Morales, 2008). Tal teste já foi validado por vários pesquisadores que realizam de forma conjunta o teste *Allium cepae* o

teste animal *in vitro*, obtendo resultados similares (Teixeira et al., 2003; Vicentini, 2001).

## 2.6 Considerações sobre Genotoxicidade

A genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias possuem de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos, desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (Combes, 1992).

Inúmeras técnicas que detectam danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica (Tice et al. 2000), alguns ensaios são: teste de micronúcleos (Silva et al., 2003), o ensaio do Cometa (Snyder e Green, 2001) e pelo uso de bioindicadores como *Allium cepa* e *Pisum sativum* (Mello et al., 2014).

A espécie *Allium cepa* contém células meristemáticas homogêneas com poucos e grandes cromossomos ( $2n = 16$ ), facilmente corados e bem visíveis, o que permite uma melhor avaliação dos danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular, sendo frequentemente utilizada na avaliação de genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade de várias substâncias, obtendo altas correlações com outros testes biológicos, como por exemplo, os testes com mamíferos (Kuras et al., 2006; Fernandes et al., 2009)

Resultados dos testes com bioindicadores como *Allium cepa* e *Pisum sativum* podem indicar a presença de substâncias tóxicas, citotóxicas e até mutagênicas em extratos vegetais, e que pode colocar em risco a sobrevivência dos organismos. O *Allium cepa* (cebola comum) é considerado um dos vegetais mais usados nos biotestes para análises de genotoxicidade (Fiskejö, 1993). Além de ser um ensaio de curto prazo com muitos benefícios e com baixo custo, fácil manipulação, apresenta cromossomos com boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular (Belcavello et al., 2012; Braga et al., 2015).

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJIBADÉ, Y.; SAAD, H.; KUBALLA, B.; BECK, J. P.; SÉVENET, T.; CABALION, P.; ANTON, R. In vitro Cytotoxicity of Polyindolenine Alkaloids on Rat Hepatoma Cell

Lines. Structure Activity Relation ships. **Journal of Ethnopharmacology**, 29:127-136, 1990.

AKORODA, M. D. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. **Euphytica**, 32(3):831- 838, 1983.

ASSIS, M. C; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” -*Psychotria ipecacuanha*(Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 22: 205–216, 1999.

AULER, N. M. F.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. The genetic and conservation of *Araucaria angustifolia*. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25:323-327, 2002.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, 10:140-145, 2012.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, 42: 565-569, 2004.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2A/C</sub> serotonin modulator. **Journal of Natural Products**, v:374-380, 2005.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Ambiente e Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, 10:130-140, 2015.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72:722-725, 2010.

COELHO, C.P.; BARBOSA, A.G. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotys* Ruiz e Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira de Botânica**, 26:403-413, 2003.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry e Industry**, 24: 950-954, 1992.

CORRÊA, A. M.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype characterisation of Brazilian species of the genus *Psychotria* L. — subfamily Rubioideae (Rubiaceae). **Journal Environmental Kew Bull**, 65: 45- 52, 2010.

CORRÊA; A.M. E FORNI-MARTINS; E.R. Chromosomal studies of species of Rubiaceae (A. L. de Ussieu) from the Brazilian cerrado. **Caryologia**, v:250-258, 2004.

KIEHN, M. Karyosystematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Sri Lanka. **Plant Systematics and Evolution**, 154:213-223, 1986.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C, de S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia, Ciência e Agropecuária**, 6:33-38, 2012.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach** (the practical approach series). New York, Oxford: University press, 1992, p. 250.

DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. e GOVAERTS, R. The typification and characterizations of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal Linnean Society** 135: 35 – 42, 2001.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, 63: 101-128, 2012.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 1680-1686, 2009.

FERREIRA, C. A.; PINHO, E. V. R. V.; ALVIM, P. O.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 6:159-173, 2007.

FISKESJÖ, G. *Allium* test: In vitro toxicity testing protocols, Meth. **Molecular Biology**, 43:119-127, 1995.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N.C.; MOURA, D.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A.G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in vitro**, v:559–566, 2008.

FRESCURA, V. D. S.; KUHN, A. W.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; NICOLOSO, F. T.; LOPES, S. J.; TEDESCO, S. B. Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (Rubiaceae) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (Brassicaceae). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 66:138–144, 2012.

GERLACH, S. L.; BURMAN, R.; BOHLIN, L.; MONDAL, D.; RANSSON, U. G. Isolation, Characterization, and Bioactivity of Cyclotides from the Micronesian Plant *Psychotria leptothyrsa*. **Journal of Natural Products**, v: 1207– 1213, 2010.

GOMES, R. S. D. L.; OLIVEIRA, V. D. C.; RIBEIRO, R. L.; JÁCOME, P.; PINTO, J.E. B. P.; LAMEIRA, O. L. Estudo morfoanatômico comparativo entre a poaia (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes- Rubiaceae) obtida da região Amazônica (habitat original) e proveniente de processo biotecnológico submetida a diferentes tratamentos de interceptação da radiação solar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(1B): 276-283, 2009.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

HAMILTON, C. W. A revision of Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). Introductions and species. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 67, 1989.

HEYWOOD, V. H; BRUMMITT, R. K; CULHAM, A.; SEBERG, O. **Flowering Plant Families of the World**. Ontario, Canada: A Firefly Book, 2007. v. 6, 424p.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V.L; HEIDEN, G.; STEIN, V.C; ROCHA, B.H.G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos Inst. Biology**, 73:79-82, 2006.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. 1993 Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado. IN: LOVE, R.M. 1949 **La citología como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales**. Revista Argentina Agronômica 1:1-13.

KIEHN, M. Karyosystematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Sri Lanka. **Plant Systematics Evolutuion** 154:213-223, 1986.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; PASSOS, C. S.; MORAES, A. P.; WAKUI, V. G.; KONRATH, E. L.; NURISSO, A.; CARRUPT, P. A.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; HENRIQUES, A. T. Indole Alkaloids and Semisynthetic Indole Derivatives as Multifunctional

Scaffolds Aiming the Inhibition of Enzymes Related to Neurodegenerative Diseases – A Focus on Psychotria L. Genus. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v:1056-1075, 2014.

KOCH, A. K.; SILVA, P. C.; SILVA, C. A. Biologia reprodutiva de Psychotria carthagenensis (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento florestal de mata ciliar, centro-oeste do Brasil. **Rodriguésia**,61(3):551-558, 2010.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.)DC. **Journal of Enthonopharmacology**, 107: 211 - 221, 2006.

LAMEIRA, O.A. **Cultivo da ipecacuanha [Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes]**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2002. p.1-4. (Circular Técnica n.28).

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research**, 650: 80-86, 2008.

LIU, D.; JIANG, W. L. M. Effects of trivalente and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, 117: 23-29, 1992.

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

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; CAMPO, A. D. Montiel, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, 94: 221-226, 2004.

MARTINS, L. A. R; LAVIOLA, B. G.; PRAÇA-FONTES, M. M. Viabilidade polínica de *Jatropha curcas* L.: uma comparação metodológica. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, 8: 7-14, 2012.

MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, L. O.; MAIA, J. T. L. S.; VIEIRA, I. J. C. Estudo ecogeográfico da poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. **Revista brasileira de plantas medicinais**, 11:24 – 32, 2009.

MELLO, V. S.; MIRANDA, D. P.; SILVA, D. D.; MACHADO, D.; SILVA, A. B.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Efeito genotóxico de licor pirolenhoso de teca pelo bioindicador ervilha. **Estudos**, 41: 141-146, 2014.

MELO, N. F. Citogenética vegetal aplicada à taxonomia e ao melhoramento. In: XXVII Reunião Nordestina de Botânica, Petrolina, 2004. **Anais...** Petrolina, 2004, p.1-4.

NUNES, A. P. M.; ARAÚJO, A. C. Ausência de genotoxicidade e esteviosídeo em *E. coli*. In: Semana de iniciação científica da universidade do estado do rio de janeiro, 10, 2003, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro, 2003. p.15.

OLIVEIRA, A. M., LEMOS, R. P. L., CONSERVA, L. M.  $\beta$ -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 50: 339–341, 2013.

OLIVEIRA, L.O.; MARTINS, E.R. **O desafio das plantas medicinais brasileiras: O caso da poaia**. Campos dos Goytacazes: UENF, 1998. 73p.

PAIVA, R.J.; FILHO, A. M.; PEREIRA-MOURA, P. G; Rubiaceae ornamentais do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. **Floresta e Ambiente**, 16:39 - 46, 2009.

PIO, L. A.; RAMOS, D. J.; PASCAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 147- 153, 2007.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase -telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, 312: 17-24, 1994.

ROSSI, A. A. B.; CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; OLIVEIRA, L. O. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. **Cytologia**, 73(1): 53–60, 2008.

ROUT, G. R., SAMAMTARAY, S. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Scientia Horticulturae**, 86: 71–79, 2000.

SEREJO, J.N. Comportamento germinativo e viabilidade polínica de *Passifloras* oriundos de flores coletadas em diferentes estádios e horários. IN: VI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, v.6, 2011, Búzios-RJ. **Anais...**Campos dos Goytacazes-RJ: SBMP, 2011, p.1-4.

SHARMA, A.K; SHARMA, A. **Chromosome techniques**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994, p.367.

SHIVANA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology**. A laboratory manual. 1.ed. Berlin:Springer-erlag, 1992,119p.

- SILVA, P. C.; NASCIMENTO, T. O.; SILVA, C. G.; DALBOSCO, E.Z.; HIEGA, K.M.R.; SILVA, C.A. Poaia: o “ouro preto” do Mato Grosso. **Revista MT Horticultura**, Tangará da Serra, 1:31-34, 2015.
- SILVA, C.A. **Biologia reprodutiva de três espécies distílicas de *Psychotria* L. e efeitos da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *P. hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 63p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento).
- SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BEZERRA, R. J. A. C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 14: 1-3, 2004.
- SILVA, J., ERDTMANN, B. e HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003, 344 p.
- SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, 488:151-169, 2001.
- SOUZA, M. M., MARTINS, E. R., PEREIRA, T. N. S. and OLIVEIRA, L. O. Reproductive studies on ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich; Rubiaceae): meiotic behavior and pollen viability. **Brazilian Journal Biology**, 66: 151–159, 2006.
- STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnoldo, 1971, 216 p.
- TAYLOR, C. M. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Netropics. **Opera Botanica Belgica**, 7: 261 – 270, 1996.
- TEIXEIRA, V. A., COELHO, M.F.B., MING, L. C. Poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stoves]: aspectos da memória cultural dos poaieiros de Cáceres - Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v: 335- 343, 2012.
- TEIXEIRA, L.A.G.; MACHADO, I.C. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, 18:853-862, 2004.
- TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides*: L medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Genetic Molecular Biology**, 26:551- 555, 2003.
- TICE, R. R.; AGUREL, E.; ANDERSON, D.; BRULINSON, B.; HARTMANN, A.; KABAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. The single cell

gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.

**Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35: 206-221, 2000.

VEROTTA, L., PILATI, T., TATO, M., ELISABETSKY, E., AMADOR, T. A., NUNES, D. S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of natural products**, 12:392-396, 1998.

VIEIRA, A. **Citogenética e quantificação de DNA de cinco espécies e um híbrido do gênero *Catasetum* (Orchidaceae)**. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2013. 67p. (Dissertação – Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas).

VICENTINI, V.E.P. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 23:593-598, 2001.

#### 4.1 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA, DETECÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO E BANDEAMENTO C EM *Psychotria ipecacuanha*, MATO GROSSO, BRASIL.

##### RESUMO

O gênero *Psychotria* é o maior da família Rubiaceae, com cerca de 1.600 espécies de distribuição tropical, e se destaca pela produção de alcalóides bioativos amplamente utilizados na pesquisa de novos fármacos, no entanto possui complexa taxonomia, o que dificulta a identificação taxonômica correta de suas espécies. Técnicas de citogenética fornecem informações que podem ser utilizadas na diferenciação inter- e intraespecífica, auxiliando no posicionamento taxonômico de espécies em termos evolutivos do cariótipo. Deste modo o presente estudo teve como objetivo analisar citogeneticamente uma população de *Psychotria ipecacuanha* do estado de Mato Grosso, por meio de técnicas convencionais, morfometria cromossômica e bandeamento cromossômico, com a finalidade de detectar possíveis polimorfismos cromossômicos entre as mesmas, além de estabelecer técnicas de Ag NOR e verificar o padrão de bandas obtidos com bandeamento C. Os meristemas radiculares da espécie, foram submetidos ao tratamento de bloqueio em solução de 3 $\mu$ M de APM durante 18 horas a 4°C, em seguida, as raízes foram lavadas em três trocas em água destilada e fixadas em metanol: ácido acético na proporção 3:1, transferidas para tubos Eppendorf® contendo enzima Pectinase na concentração de 3 $\mu$ M, permanecendo a 35 °C em banho-maria por 2 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular. A partir das análises citogenéticas conclui-se que *P. ipecacuanha*, possui um complemento diploide de 22 cromossomos, com um cariótipo composto de 7 pares de cromossomos metacêntricos e 4 pares de cromossomos submetacêntricos permitindo descrever sua fórmula cariotípica de 7M + 4SM, a impregnação por nitrato de prata demonstrou haver um par de regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), na porção telomérica do par de cromossomos “4” e o bandeamento C, revelou quatro blocos heterocromáticos de tamanhos desiguais, o que pode ter sido causado por translocações Robertsonianas.

**Palavras-chave:** Dissociação celular, RON ativa, bandeamento.

## **CHROMOSOMAL MORPHOMETRY, DETECTION OF THE NUCLÉOL ORGANIZER REGIONS AND BANDING C IN *Psychotria ipecacuanha*, MATO GROSSO, BRAZIL.**

### **ABSTRACT**

The genus *Psychotria* is the largest of the Rubiaceae family, with around 1600 species of tropical distribution, and is notable for the production of bioactive alkaloids widely used in the research of new drugs, however it has complex taxonomy, which makes difficult the correct taxonomic identification of its species. Cytogenetic techniques provide information that can be used in inter- and intraspecific differentiation, aiding in the taxonomic positioning of species in evolutionary terms of the karyotype. In this way the present study aimed to analyze a population of *Psychotria ipecacuanha* from the state of Mato Grosso using conventional techniques, chromosomal morphometry and chromosomal banding, with the purpose of detecting possible chromosomal polymorphisms between them, besides establishing techniques of Ag NOR and to verify the pattern of bands obtained with C-banding. The root meristems of the species were subjected to blocking treatment in 3 $\mu$ M solution of APM for 18 hours at 4°C, then the roots were washed in three exchanges in distilled water and fixed in 3: 1 methanol: acetic acid, transferred to Eppendorf® tubes containing 3  $\mu$ M Pectinase enzyme, remaining at 35 ° C in a water bath for 2 hours. The blades were prepared by the cell dissociation technique. From the cytogenetic analyzes it is concluded that *P. ipecacuanha* has a diploid complement of 22 chromosomes, with a karyotype composed of 7 pairs of metacentric chromosomes and 4 pairs of submetacent chromosomes, allowing to describe its 7M + 4SM karyotype formula, impregnation by silver nitrate showed a pair of active nucleolar organizing regions (RON active) in the telomere portion of the pair of chromosomes "4" and the C-banding revealed four heterochromatic blocks of unequal sizes, which may have been caused by Robertsonian translocations.

**Key words:** Cellular dissociation, active RON, banding.

## INTRODUÇÃO

*Psychotria* é o maior gênero da família Rubiaceae, com cerca de 1.600 espécies de distribuição tropical, e se destaca pela produção de alcaloides bioativos amplamente utilizados na pesquisa de novos fármacos, no entanto possui complexa taxonomia, o que dificulta a identificação taxonômica correta de suas espécies (Morellato, 1992).

No Brasil, os estudos cromossômicos na família Rubiaceae estão concentrados no gênero exótico *Coffea* L., com muitos resultados de caracterização cariotípica mediante a análise de cromossomos mitóticos (Krug, 1934) e meióticos em paquíteno, com coloração convencional. Dentro do gênero *Psychotria* poucas espécies são estudadas citogeneticamente, dados já descritos relatam números cromossômico variando desde  $2n = 22$  ( $n = 11$ ) em inúmeras espécies, até números relativamente altos, como  $2n = 132$  em *Psychotria mahonii* C.H. Wright (Kiehn, 1986; Pinto-Maglio e Cruz, 1988; Morellato, 1992). Além das diferenças nos números cromossômicos, observa-se grande variação em relação ao tamanho dos cromossomos e também na fórmula cariotípica de suas espécies, o que dificulta a taxonomia dentro do gênero.

Do ponto de vista citogenético são poucas as espécies neotropicais que possuem dados citogenéticos, e a maioria dos registros que constam na literatura são apenas de contagem do número cromossômico o que deixa lacunas quanto a padrões evolutivos de bandas heterocromáticas e regiões organizadoras do nucléolo (Griffith et al., 2003).

Análises citogenéticas representam uma fonte de informações que podem ser utilizadas em estudos citotaxonômicos, já que o número cromossômico, padrões de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo podem variar dentro de um mesmo táxon ou entre táxons, desta forma tais análises possibilitam a compreensão das relações de parentesco entre as espécies. Além de determinar a variabilidade genética disponível em espécies com potencial medicinal, para caracterização do germoplasma e para o estudo da biodiversidade (Boff e Schifino-Wittmann, 2002).

Os padrões cromossômicos obtidos de forma convencional muitas vezes não são suficientes para uma análise mais detalhada do cariótipo. Técnicas de

coloração cromossômica diferencial como a coloração por nitrato de prata (Ag-NOR) e bandeamento C, demonstram ser ferramentas de grande auxílio no estudo refinado do cariótipo.

A heterocromatina constitutiva se caracteriza por ter excessiva quantidade de DNA repetitivo (AT, GC) com replicação tardia, estando possivelmente ligada a processos de silenciamento gênico e ser pobre em genes. O bandeamento C consiste na identificação de regiões ricas em heterocromatina, atuando de forma corrosiva sobre os cromossomos promovendo remoção parcial de DNA e proteínas cromossomais, principalmente em regiões eucromáticas, mas como a heterocromatina é mais resistente, gera um padrão de blocos heterocromáticos (Summer, 2003; Besendorfer et al., 2002). Dentro de uma única espécie, polimorfismo no número e comprimento de bandas pode ocorrer com frequência e a quantidade de heterocromatina varia de qualquer maneira.

Já a técnica por coloração por nitrato de prata identifica as regiões ativas de regiões organizadoras de nucléolos, marcando as formas ativas da região do DNAr 45S e evidenciando a posição e números de DNAs ribossomais, as RONS ativas são aquelas em que o rDNAs estão associados com proteínas que se reagem com a prata (Neves et al., 2005; Clarindo e Carvalho 2009; Margonar et al., 2012). Tais técnicas fornecem informações que podem ser utilizadas na diferenciação inter- e intraespecífica, auxiliando no posicionamento taxonômico de espécies em termos evolutivos do cariótipo.

Diante do exposto o presente estudo teve como objetivo analisar citogeneticamente uma população de *Psychotria ipecacuanha* do estado de Mato Grosso, por meio de técnicas convencionais, morfometria cromossômica e bandeamento cromossômico, tendo como finalidade detectar possíveis polimorfismos cromossômicos entre as mesmas, estabelecer técnicas de Ag NOR e verificar o padrão de bandas obtidas com bandeamento C.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus

Alta Floresta – MT, utilizando exemplares de *Psychotria ipecacuanha*, de uma população de Tangará da Serra (S 14°38' e W 57°20').

Para a obtenção de cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos, foram coletadas radículas de estacas da população. A fim de obter um maior número de metáfases, as raízes foram submetidas ao pré-tratamento com bloqueador APM na concentração de 3µM, as quais ficaram em contato com o anti-tubulinico por um período de 18 horas a uma temperatura de 4°C. Após o tratamento, as raízes foram secas em papel absorvente e fixadas em metanol: ácido acético na proporção de 3:1. O fixador foi trocado três vezes, e as amostras permaneceram por 24 horas na solução fixadora, sendo posteriormente estocadas a -5°C até o momento de uso (Carvalho et al., 2005).

Para a realização da digestão celular, os meristemas radiculares foram lavados, digeridos com enzima Pectinase Sigma® durante 2 horas a 34°C. Posteriormente as raízes foram lavadas com água destilada com três trocas consecutivas, e fixadas em metanol:ácido acético. O material fixado foi armazenado sob refrigeração (4°C) por no mínimo 24 horas antes do preparo das lâminas.

As lâminas foram confeccionadas por dissociação do meristema radicular, secadas ao ar em movimentos rápidos e em placa aquecedora a 50°C, seguindo a metodologia descrita por Carvalho e Saraiva (1993). As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 5% (Merck KGaA) em um tampão de fosfato (pH 6,8) durante 5 minutos, posteriormente lavadas duas vezes em água destilada e secas ao ar. Foram analisadas trinta metáfases, sendo as melhores imagens fotografadas com o uso de objetiva de 100X de um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ V1. 7.0.

### **Bandeamento com nitrato de prata- Ag-NOR**

Para o tratamento com nitrato de prata, seguiu-se a metodologia descrita por Funaki et al. (1975), realizando os seguintes passos:

1º As lâminas foram preparadas de acordo com o item anterior e envelhecidas por 20 dias;

2º Foi preparado solução de 50% de nitrato de prata;

3º Sobre cada lâmina contendo o material pra análise foi gotejada de 3 a 4 gotas da solução de nitrato de prata;

4º As lâminas foram cobertas com lamínulas;

5º As lâminas foram incubadas em câmara úmidas e mantidas por 19 horas em temperatura controlada de 34° C em estufa.

6º. Finalizado o período de incubação, as lamínulas foram retiradas com jato de água e as lâminas lavadas com água destilada por cerca de 2 minutos.

### **Bandeamento C**

Para o estudo da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por Summer (1972) por meio do bandeamento C, seguindo os procedimentos abaixo:

1º- As lâminas preparadas foram envelhecidas por 20 dias;

2º As lâminas já contendo o material para análise, foram tratadas com HCl 1N em temperatura ambiente (25° C), em estufa, por 15 minutos.

3º As lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

4º Incubou-se as lâminas em solução salina de 2xSSC, a 60°C em banho-maria por 15 minutos.

5º Lavou-se em água corrente e deixou-se secar ao ar.

6º Incubou-se as lâminas por 30 segundos em solução de hidróxido de bário (BaOH), em banho-maria a 42°C, sendo o BaOH recém preparado e filtrado.

7º Lavou- se a lâmina rapidamente em solução de HCl 1N, e depois em água deionizável, e deixou- se secar ao ar.

8º Incubou-se a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora.

9º Lavou-se as lâminas em água corrente e deixou secar ao ar.

10º Corou as lâminas com Giemsa 5% durante 4 minutos.

11º A lâmina foi lava em água corrente, seca ao ar, e analisada em microscópio óptico na ocular de 100x.

## **Análises dos dados cromossômicos**

Para a obtenção das medidas dos cromossomos foi usado o programa MicroMeasure versão 3.3 (MM), próprio para análises das medidas cromossômicas e disponibilizado no site <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>, pelo departamento de Biologia da Universidade do Estado do Colorado –EUA (Colorado State University) (Reeves, 2015; Reeves, 2003).

A nomenclatura para a morfologia cromossômica adotada foi a de Levan et al. (1964), os pares cromossômicos foram alinhados pelos centrômeros e numerados em ordem decrescente de tamanho. Para a caracterização do cariótipo foram utilizadas medidas dos CTC (comprimento total de cromatina), calculado mediante somatória do tamanho individual de todos os cromossomos, IC (índice centromérico) de cada par cromossômico calculado de acordo com Levan (1964). Os cariótipos foram montados a partir das imagens capturadas em contraste de fase as quais foram editadas com o programa Corel Draw.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As análises das metáfases evidenciaram que *Psychotria ipecacuanha* possui complemento diplóide de  $2n=22$  cromossomos (Figura 1), corroborando com o número básico descrito para o gênero de  $n=11$  cromossomos, e com dados descrito para a espécie por Rossi et al., (2008).

A análise da morfometria cromossômica revelou um cariótipo composto de 7 pares de cromossomos metacêntricos e 4 pares de cromossomos submetacêntricos permitindo descrever sua fórmula cariotípica de  $7M + 4SM$  (Tabela 1). O gênero *Psychotria* é caracterizado por apresentar uma simetria no cariótipo, com prevalência de cromossomos metacêntricos (Corrêa e Forni-Martins, 2004). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com dados já descritos na literatura.

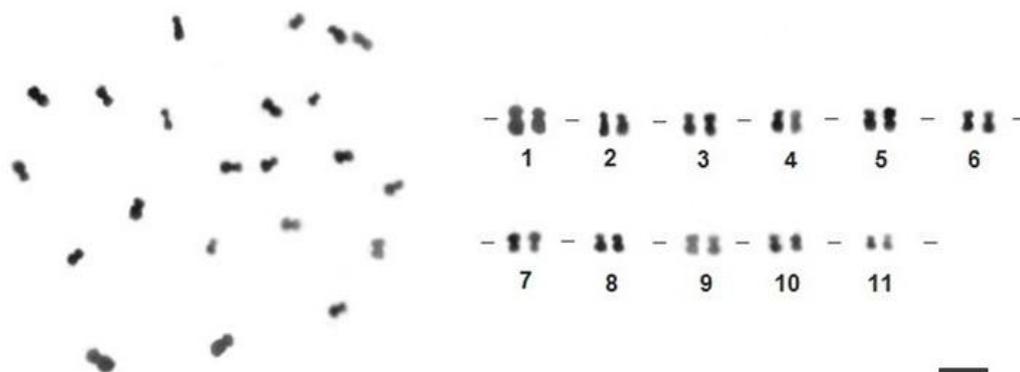


Figura 1. Metáfase mitótica de *Psychotria ipecacuanha*, pré-tratados com 3 $\mu$ M de APM por 18 horas a 4°C e corados com Giemsa 5% por 3 minutos. Barra= 10  $\mu$ m.

Tabela 1. Apresentação da morfologia dos cromossomos metafásicos de *P. ipecacuanha* 2n=22 cromossomos. IC= Índice centromérico, R= razão entre braços, M= metacêntrico, SM= submetacêntrico

Cromossomo	Comprimento total ( $\mu$ m)	Braço ( $\mu$ m)		R	IC	Morfologia cromossômica
		Longo	Curto			
1	5,67	3,42	2,25	1,59	39,18	SM
2	4,91	3,12	1,79	1,86	36,65	SM
3	4,53	2,65	1,88	1,41	41,58	M
4	4,48	2,68	1,80	1,53	40,11	SM
5	4,43	2,48	1,96	1,27	44,16	M
6	4,06	2,12	1,94	1,09	47,84	M
7	4,00	2,11	1,89	1,12	47,24	M
8	3,92	2,32	1,60	1,46	40,70	M
9	3,81	2,13	1,68	1,27	44,10	M
10	3,49	2,10	1,39	1,52	39,74	SM
11	3,10	1,82	1,28	1,44	41,24	M

O comprimento total dos cromossomos variou de 5,67  $\mu$ m á 3,10  $\mu$ m. John (1980) relata que o comprimento de um cromossomo é considerado uma constante e, portanto é uma de suas propriedades características. Podendo ser classificados como longos (>10  $\mu$ m), médios (4-8  $\mu$ m) ou curtos (<4  $\mu$ m). Dessa forma, *P. ipecacuanha* apresentou cromossomos considerados curtos e médios, o que difere dos resultados encontrados por Rossi et al., (2008), onde os cromossomos tiveram seus tamanhos variando de 3,97 á 2,53, sendo classificados como cromossomos curtos, sem a presença de cromossomos médios como os encontrados no presente

estudo. Tais variações morfológicas muitas vezes estão associadas a variações dentro da própria espécie, ou ao grau de compactação da cromatina, dependendo da substância química utilizada e do tempo de ação dos agentes bloqueadores (Margonar et al., 2012).

O valor médio da razão entre os braços longos e curtos (R) foi de 1,86  $\mu\text{m}$  a 1,09  $\mu\text{m}$  e o índice centromérico variou de 47,84  $\mu\text{m}$  a 36,65  $\mu\text{m}$ . Corrêa e Forni-Martins (2004) apresentaram o ideograma de *P. deflexa* DC. ( $2n = 32$ ), descrevendo um cariótipo composto de cromossomos médios e curtos, sendo a maioria submetacêntricos, levando a um ideograma com taxa de simetria de TF%=40,06. Deste modo os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os descritos para o gênero *Psychotria*.

### Bandeamento NOR

A impregnação por nitrato de prata (Ag-NR), revelou um par de regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), na porção telomericada par de cromossomos "4" (Figura 2). Regiões marcadas positivamente com AgNOR, correspondem aos locais que estavam ativos, precedendo a intérfase, onde ocorrem processos de síntese dos RNAs ribossomais, que participam da formação das proteínas (Roussel et al., 1996; Sumner 2003).



Figura 2. Metáfase mitótica de *P. ipecacuanha*, pré-tratados com 3  $\mu\text{M}$  de APM por 18 horas a 4°C e submetidos ao bandejamento AgNO<sub>3</sub> por 18 horas a 34°C. Cromossomos com banda NOR positiva na porção telomérica do braço longo, nos grupos cromossômicos (4). Barra= 10  $\mu\text{m}$ .

Em estudo com *Genipa americana*, espécie da família Rubiaceae, Pierozzi e Mendaçolli (1997) identificaram por meio da análise citológica, que somente o

cromossomo 4 é associado com a região organizadora de nucléolo. Já Guerra (1993), concluiu que o cromossomo 11 está associado com a NOR, baseado nos sinais de cromomicina positivo no segmento terminal. No presente estudo também foram encontrados apenas um par de RONS ativos, corroborando com dados existentes para a família.

Técnicas como o bandeamento Ag-NOR, tem se mostrado um importante instrumento na compreensão da evolução das espécies, pois possibilitam avaliações detalhadas da presença e posição das bandas cromossômicas, o que facilita a identificação e caracterização de cromossomos praticamente idênticos, rearranjos cromossômicos, comparação entre espécies e as transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas e com cariótipos parecidos (Guerra, 1988; Almeida, 2008). Toledo et al. (2014) relatam que dados sobre as regiões organizadoras de nucléolo, contribuem no aumento da eficiência de estratégias de conservação, no estudo da evolução e também nos trabalhos de melhoramento genético. Deste modo os dados encontrados no presente estudos serão úteis em pesquisas taxonômicas, evolutivas, genéticas, contribuindo em programas de melhoramento do gênero.

### **Bandeamento C**

O bandeamento C diferencia regiões de heterocromatina constitutiva que são seqüências de DNA altamente repetitivas as quais não codificam proteínas, ou seja, não possuem atividade gênica, esse procedimento pode ser empregado na caracterização de diferentes acessos de uma mesma espécie, na detecção de alterações estruturais, como deleções, inversões e translocações (Gill et al., 1991) e na identificação de linhas de adição e de substituição (Friebe et al., 1993). Neste estudo, o bandeamento C revelou que os pares 4 e 5, possuem dois blocos heterocromáticos de tamanhos desiguais (Figura 3).



Figura 2. Metáfase mitótica de *P. ipecacuanha*, pré-tratados com 3 $\mu$ M de APM por 18 horas a 4°C e submetidos ao bandejamento C. Barra= 10  $\mu$ m.

O aparecimento de blocos heterocromáticos desiguais como os observados no presente estudo, pode ser devido á translocações Robertsonianas (forma comum de rearranjo cromossômico), inversões e translocações desiguais (Romero, 1986). Técnicas de bandejamento cromossômico, como o bandemaneto C, ampliam os horizontes da citogenética, pois facilitam o pareamento cromossômico e montagem de cariótipos, além de auxiliar no entendimento das realações evolutivas das espécies ou grupos taxonômicos.

## CONCLUSÃO

*Psychotria ipecacuanha* possui um complemento diploide de 22 cromossomos, com um cariótipo composto de 7 pares de cromossomos metacêntricos e 4 pares de cromossomos submetacêntricos permitindo descrever sua fórmula cariotípica de 7M + 4SM, a coloração com nitrato de prata revelou um par de regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), na porção telomérica do par de cromossomos “4” e o bandejamento C corou de forma diferencial quatro blocos heterocromáticos de tamanhos desiguais, o que pode ter sido causado por translocações Robertsonianas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.B. **Citogenética de *Tamarindus indica* L.** Alta Floresta: Universidade do Estado do Mato Grosso, 2008. 31f. (Monografia - Especialização em Biologia).  
 ANDREY JEFFER MACIEL TOLEDO, A. J.M.; RICARDO GALLO, R.;  
 NASCIMENTO, H. R.; KARSBURG, I. V. Morfometria cromossômica e identificação

da região organizadora nucleolar em cromossomos de *Cassia fistula* L. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, 8: 61-69, 2014.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 139: 99-108, 2002.

BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMAN, M.T. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. **Tropical Grasslands**, 36: 54-8, 2002.

CARVALHO, J.F.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro induction of polyploidy. In anatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 80:69-75, 2005.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic e Histochemistry**, 68:142-145, 1993.

CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, 28: 73-81, 2009.

CORRÊA, A. M.; FORNI-MARTINS, E. R. Chromosomal studies of species of *Rubia* (A. L. de Jussieu) from the Brazilian cerrado. **Caryologia**, 57(3): 250-258, 2004.

FUNAKI, K.; MATSUI, S.; SASAKI, M. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. **Chromosoma**, 58: 357-370, 1975.

FRIEBE, B.; TULEEN, N.; JIANG, J.; GILL, B. S. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. **Genome**, 36: 731-742, 1993.

GOMES, P. F. **Curso de estatística experimental**. Livraria Nobel S.A. São Paulo, SP, 2000. 477p.

GRIFFITH, O. L.; MOODIE, G. E. E.; CIVETTA, A. Genome size and longevity in fish. **Experimental Gerontology**, 38: 333-337, 2003.

GUERRA, M.S. **Introdução a citogenética geral**. São Paulo: Guanabara, 1988. 135p.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, 34: 830-839, 1991.

HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of compositae – VIII. Further studies on the chromosome of Asteride. **American Journal of Botany**, 49:116-119, 1962.

JOHN, B. **Citogenética de populações**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária e EDUSP, 1980. 84p

KIEHN, M. Karyosystematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Srianka. **Plant Systematics. Evolution**, 154:213-223, 1986.

KRUG, C. A. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. **Boletim Técnico** 11, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP, 1934.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.

MARGONAR, M. A. S.; KARSBURG, I. V.; BONA, D. A. O. Identificação da região organizadora nucleolar de *Jatropha curcas* L. **Estudos**, 339: 165-173, 2012.

MORELLATO, L. P. C. Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. Pp. 98-110. In: L. P. C. Morellato (Org.), **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Editora da Unicamp, Campinas, 1992.

NEVES, N. et al. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetics and Genome Research**, 109: 104–111, 2005.

PIEROZZI, N. I.; MENDAÇOLLI, S. L. J. Karyotype and C-band Analysis in Two species of *Genipa americana* L. (Rubiaceae, Gardenieae Tribe). **Cytologia**, 62:81-90, 1997.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. Arabica* L. complement. **Caryologia** 51(1): 19-35, 1988.

REEVES, A. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. **Genome**. 44:439-443. 2001.

REEVES, A.; TEAR, J. **MicroMeasure for Windows**, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. 2000. (20 de Setembro de 2015).

- ROMERO Z. C. A new method for estimating karyotype Taxonomy. **Táxon**, 35:526-530. 1986.
- ROSSI, A. A. B.; CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; OLIVEIRA, L. O. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. **Cytologia**, 73(1): 53–60, 2008.
- ROUSSEL, P.; ANDRÉ, C.; COMAI, L.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. **The Journal of Cell Biology**, 123: 235–246, 1996.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Science, 2003. 287p.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-306, 1972.

## 4.2 ÍNDICE MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Psychotria ipecacuanha* LOCALIZADA EM TANGARÁ DA SERRA, MATO GROSSO, BRASIL.

### RESUMO

*Psychotria ipecacuanha* é uma planta herbácea, perene, conhecida popularmente por poaia, planta medicinal, cujo uso está ligado à presença de emetina e a cefalina em suas raízes, que conferem à planta um poder emético e amebicida. O estudo da viabilidade polínica se constitui em um dos fatores de suma importância no melhoramento de plantas, pois reflete a potencialidade do gameta masculino na eficiência da fecundação. Este trabalho teve como objetivo analisar o índice meiótico (IM) e a viabilidade polínica de uma população de *Psychotria ipecacuanha*. Para as análises do índice meiótico, foram utilizadas anteras em estágio de pré antese sendo estas maceradas com uma gota de corante Orceina Acética 2%. Foram analisadas 40 lâminas, sendo contabilizadas 100 células mãe do grão de pólen (CMGP) por lâmina. Na viabilidade polínica as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento sendo comparada a eficiência de quatro corantes: lugol 2%, Reativo de Alexander, Azul de Astra e 2,3,3 Cloreto de Trifenil Tetrazólio 0,30% (TTC). Utilizou-se cinco anteras/botão/lâmina, sendo contabilizadas 10 lâminas, e 300 grãos de pólen por lâmina, totalizando 3000 grãos de pólen por corante. A população de *P. ipecacuanha* apresentou um alto índice meiótico, com valores acima de 86,2%, indicando a ocorrência de uma meiose regular, independente do corante utilizado, a taxa média percentual de viabilidade foi acima de 72%, mesmo havendo diferença significativa entre os corantes utilizados. Os resultados do presente estudo evidenciam a possibilidade de superestimação da viabilidade polínica pelo método com Lugol e Azul de Astra. Recomenda-se, pela distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis o uso do Reativo de Alexander. E por corar apenas pólen com atividade respiratória indica-se o TTC 0,30%, o qual se mostrou eficiente na estimativa da viabilidade polínica da poaia.

**Palavras-chave:** poaia, melhoramento de plantas e índice meiótico.

**MEYOTIC INDEX AND POLYNICAL VIABILITY OF A POPULATION OF *Psychotria ipecacuanha* LOCATED IN TANGARÁ DA SERRA, MATO GROSSO, BRAZIL.**

**ABSTRACT**

*Psychotria ipecacuanha* is a perennial herbaceous plant, popularly known as poaia, a medicinal plant whose use is linked to the presence of emetin and cephalin in its roots, which give the plant an emetic and amebicidal power. The study of pollen viability is one of the most important factors in plant breeding, since it reflects the potential of the male gamete in fertilization efficiency. This work aimed to analyze the meiotic index (IM) and pollen viability of a population of *Psychotria ipecacuanha*. For the analyzes of the meiotic index, anthers were used in pre-premature stage and these were macerated with a drop of Orceina Acética 2% dye. A total of 40 blades were analyzed, counting 100 pollen grain (CMGP) stem cells per slide. In the pollen viability the slides were prepared by the crushing method and the efficiency of four dyes was compared: Lugol 2%, Alexander Reactive, Astra Blue and 2,3,3 Triphenyl Tetrazole Chloride 0.30% (TTC). It was used five anthers / bud / blade, counting 10 blades, and 300 pollen grains per blade, totaling 3000 grains of pollen per dye. The population of *P. ipecacuanha* presented a high meiotic index, with values above 86.2%, indicating the occurrence of a regular meiosis, independent of the dye used, the average percentage of viability was above 72%, even though there was a significant difference among the dyes used. The results of the present study show the possibility of overestimation of pollen viability by the Lugol and Astra Blue method. It is recommended, by distinguishing between viable and non-viable pollen grains, the use of the Alexander Reactive and because only the pollens with respiratory activity were stained, the TTC was 0,30%, which was efficient in estimating the pollen viability of the poaia.

**Key words:** poaia, plant breeding and meiotic index.

## INTRODUÇÃO

*Psychotria ipecacuanha* é uma planta herbácea, perene, com 50 cm de altura, conhecida popularmente por ipeca ou poaia, é uma espécie medicinal, cujo uso farmacológico está ligado à presença de dois alcalóides em suas raízes: a emetina e a cefalina que conferem à planta um poder emético e amebicida (Costa, 1978; Sousa, 1991). A maioria dos trabalhos sobre a poaia está relacionado aos estudos farmacológicos, o que deixa lacunas, principalmente no que se refere à taxonomia, morfologia, conservação e citogenética (Teixeira et al., 2012).

A caracterização citogenética envolve, entre outros aspectos, a contagem do número cromossômico, determinação do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e da fertilidade de pólen, além de esclarecer possíveis erros ocorridos durante a divisão celular. O surgimento de grãos de pólen anormais, ou inviáveis, pode ser resultado de irregularidades cromossômicas como: aberrações estruturais e numéricas, que por sua vez, decorrem de anormalidades que podem ocorrer durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose (Corrêa et al., 2005; Pagliarini e Pozzobon, 2005; Pozzobon et al, 2015).

O estudo da viabilidade polínica se constitui em um dos fatores de suma importância no melhoramento de plantas, pois reflete a potencialidade do gameta masculino na eficiência da fecundação e posterior fertilização (Biondo e Battistin, 2001). Além de ser um fator importante na distinção das espécies pela morfologia e viabilidade (Karsburg e Battistin, 2005). Por meio dos dados de viabilidade polínica, é possível obter correlações com anormalidades meióticas, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre a eficiência de cruzamentos (Horner e Palmer 1995; Love, 1951; Corrêa et al., 2005;).

Dentre os corantes mais utilizados para avaliar a viabilidade polínica, destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Stanley e Linskens, 1974; Sharma e Sharma, 1994), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo. Esses corantes têm uma aplicação limitada, pois coram somente pólenes funcionais, enquanto que os inviáveis são identificados por não corarem. Desse modo não são adequados para espécies cujos grãos de pólen apresentam paredes espessas e mucilaginosas, pois dificultam a sua penetração, impedindo a coloração.

Nessa condição, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e serem equivocadamente classificados como abortados (Alexander, 1980).

A literatura mostra que os sais de tetrazólio, advindos do corante 2,3,5 trifenil tetrazólio, se reduzem nos tecidos vivos, resultando em um composto de cor vermelha (formazan), tal composto é formado pela catalise das reações respiratórias nas mitocôndrias pelas enzimas desidrogenases durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Quando o tetrazólio é reduzido, formando trifenilformazan, indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, o que significa que há viabilidade das células e, portanto, dos tecidos. Assim, a coloração resultante da reação é indicação da viabilidade pela detecção da respiração celular. Tecidos não viáveis não reagem e, conseqüentemente, não se colorem (Costa et al. 2007, Lauton et al., 2016; Macedo et al., 2016). De acordo com o exposto este trabalho teve como objetivo analisar o índice meiótico (IM) e a viabilidade polínica de uma população de *Psychotria ipecacuanha*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Alta Floresta – MT.

### **Material vegetal e local de coleta**

Na época de floração foram coletados botões florais em pré- antese de diferentes tamanhos e em diferentes estágios de desenvolvimento, de *Psychotria ipecacuanha*, provenientes de uma população do município de Tangará da Serra (S 14°38' e W 57°20').

### **Análise dos produtos meióticos: estimativa do índice meiótico**

Durante o período de floração, botões florais de diferentes tamanhos e em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em solução de etanol: ácido acético, na proporção de 3:1.

Para o preparo das lâminas os botões florais foram lavados em água destilada por 15 minutos, realizando-se 3 trocas. As lâminas foram preparadas com o procedimento padrão da técnica de esmagamento usando-se coloração com o corante orceína acética 2%. Para isso os botões florais foram dissecados em microscópio estereoscópio, tendo as 5 anteras retiradas e maceradas sobre uma lâmina contendo uma gota do corante. Essa operação foi executada com o auxílio de um bastão de vidro para evitar a oxidação do material. Em seguida as lâminas foram confeccionadas e levadas para análise em campo claro em microscópio óptico.

Foram analisadas 40 lâminas, sendo contabilizadas 100 células mãe do grão de pólen (CMGP) por lâmina, perfazendo um total de 4000 CMGP. Para tanto foi utilizado o método de varredura.

Para a estimativa do índice meiótico (IM), quantificou-se o número de produtos pós-meióticos, denominados: díades, tríades e tétrades. O IM foi calculado de acordo com Love (1949):  $IM = \frac{\text{número de tétrades normais}}{\text{número total de tétrades}} \times 100$ . As células mães de pólen com quatro micrósporos foram consideradas tétrades normais e como anormais aquelas com números de micrósporos diferentes de quatro: díades (dois micrósporos) e tríades (três micrósporos) (Corrêa et al., 2005).

### **Análise da viabilidade dos grãos de pólen**

Foi comparada a eficiência de quatro corantes: lugol 2%, Reativo de Alexander, Azul de Astra e 2,3,3 Cloreto de Trifenil Tetrazólio 0,30% (TTC) a fim de investigar qual era o mais eficiente na estimativa da viabilidade polínica da espécie. Utilizou-se cinco anteras/botão/lâmina, sendo contabilizadas 10 lâminas, e 300 grãos de pólen por lâmina, totalizando 3000 grãos de pólen por corante. Para esses corantes, a viabilidade foi determinada pela capacidade de coloração dos grãos de pólen, onde foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração da exina e da intine ou protoplasma bem definido e inviáveis aqueles que apresentaram exina corada e ausência de protoplasma. Sendo considerado como viável os grãos de pólen que adquiriram coloração marrom escuro/ preto quando corado com lugol,

azul escuro para o azul de astra, rosa/pink na reação com TTC 0,30% e para o Reativo Alexander quando a intine adquiriu cor rosa e exine verde.

Para o corante TTC foi realizado uma estimativa de tempo de coloração, para tanto as lâminas foram confeccionadas e observadas a cada 15 minutos, para determinar o tempo necessário para a ocorrência de reação de formação do formazan e consequente coloração do grão de pólen.

Para o preparo das lâminas foi utilizado o método de esmagamento, as anteras foram cortadas transversalmente com o auxílio de um bisturi, para à liberação dos grãos de pólen, sendo posteriormente maceradas levemente com um bastão de vidro, sobre uma gota do corante testado. Após esse procedimento o material foi coberto com uma lamínula e observado ao microscópio. A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura, sendo contabilizados 300 grãos de pólen/lâmina (viáveis + inviáveis), com 10 repetições cada, perfazendo um total de 3000 grãos de pólen para cada corante investigado. Todas as lâminas foram observadas sob microscópio óptico na objetiva de 40x e as imagens foram digitalizadas utilizando o fotomicroscópio Leica, acoplado à câmera digital. Com a contagem obtida em cada corante, calculou-se a percentagem de pólenes viáveis.

### **Obtenção das imagens**

As imagens foram obtidas com o uso de objetiva de 100X, em um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ V1. 7.0.

### **Análise estatística**

Foram utilizadas dez repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Programa Estatístico Sisvar ® (Ferreira, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Índice meiótico

A taxa de tétrades normais apontadas por meio dos valores do Índice meiótico (IM) foi considerada normal, com valores médios de 86,22% (Tabela 1). Uma planta para ser considerada com processo meiótico normal deve ter o IM acima de 85%, genótipos que apresentam índice meiótico abaixo deste valor podem resultar em problemas reprodutivos quando envolvidos em cruzamentos, pois são considerados instáveis citologicamente (Love 1949; Yoshitome, 2008).

Tabela 1. Número células analisadas (TC), número de células mãe do grão de pólen normais (Tétrade), e anormais (Tríade e Díade), e índice meiótico (TBF), de uma população de *P. Ipecacuanha* de Tangara da Serra, MT

TC	Tétrade	Tríade	Díade	Índice meiótico (%)
4000	3449	486	65	86,22

No estágio de tétrades normais foram consideradas aquelas que possuíam quatro micrósporos (Figura 1B). As anormalidades encontradas foram tríades e díades. As tríades foram formadas por um micrósporo maior e dois menores, ou iguais entre si (Figura 1A), enquanto as díades foram formadas por dois micrósporos de tamanhos iguais. A população de *P. Ipecacuanha* analisada apresentou um IM alto.

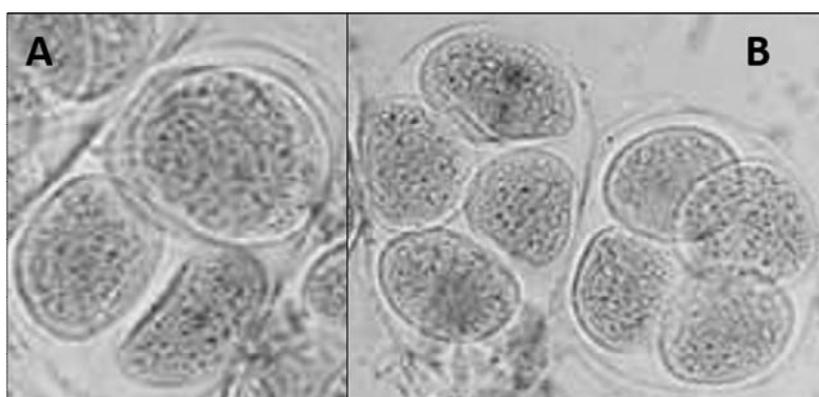


Figura 1. Células mãe do grão de pólen. Em (A) uma tríade formada por três micrósporo e em (B) uma tetrade contendo quatro micróscoporos.

Analisando o comportamento meiótico de *Lagerstroemia indica* L. Mello et al. (2016), observaram a formação de tétrades normais e de tríades, sendo o valor de IM de 93,40%, considerado alto para a espécie. O estudo meiótico é altamente importante, pois em espécies não melhoradas geneticamente, é esperado um comportamento meiótico oscilante entre os genótipos, o que poderá resultar em uma fertilidade limitada quando se considera gametas masculinos. Além disso o comportamento meiótico de uma planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade, as alterações observadas durante a divisão celular poderão refletir na viabilidade dos grãos de pólen. Deste modo, a avaliação do índice meiótico permite o estabelecimento dos perfis das plantas quanto à sua estabilidade genética e fertilidade (Defani-Scoarizes et al., 1995; Damasceno Junior et al., 2010).

### Viabilidade polínica

A determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas de infertilidade das plantas e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (Peñaloza, 1995). Observa-se que independente do corante utilizado, *P. ipecacuanha* apresentou alta taxa de viabilidade polínica, sendo a média geral para cada corante superior a 72% (Tabela 2). Valores de viabilidade acima de 70% não causa danos em trabalhos de melhoramentos de espécies, sendo que quanto mais alta for a viabilidade polínica maior será o índice de fertilização, sendo considerados como alta taxa de viabilidade do pólen valores acima de 70%; como média valores de 31 a 69% e valores até 30% como baixa viabilidade (Souza et al., 2002; Mello et al., 2016).

Tabela 2. Valores médios percentuais de viabilidade polínica de *P. ipecacuanha*, com os corantes: Azul de Astra, Lugol 2%, Reativo de Alexander e TTC 0,30%

Teste Colorimétrico	Viabilidade (%)
Azul de Astra	97,48 a
Lugol 2%	94,13 b
Reativo de Alexander	89,73 c
TTC 0,30%	72,00 d
CV (%)	2,45

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada pela utilização de várias técnicas, na citogenética, é bastante empregada no monitoramento de pólen em armazenamento, de maneira a garantir a fertilidade e com isso, tornar possível o cruzamento entre genótipos de importância econômica (Souza et al., 2002).

A maior taxa de viabilidade foi encontrada para o corante azul de astra com valor de 97,48%. Este corante reage com a celulose fornecendo uma coloração azul escura para os grãos de pólen viáveis (Figura 2G e 2H), enquanto os inviáveis adquirem coloração azul clara. Para Mello et al., (2013) o corante Azul de Astra é bastante indicado para avaliar a viabilidade do grão de pólen, corando-o de uma maneira diferencial os viáveis dos inviáveis.

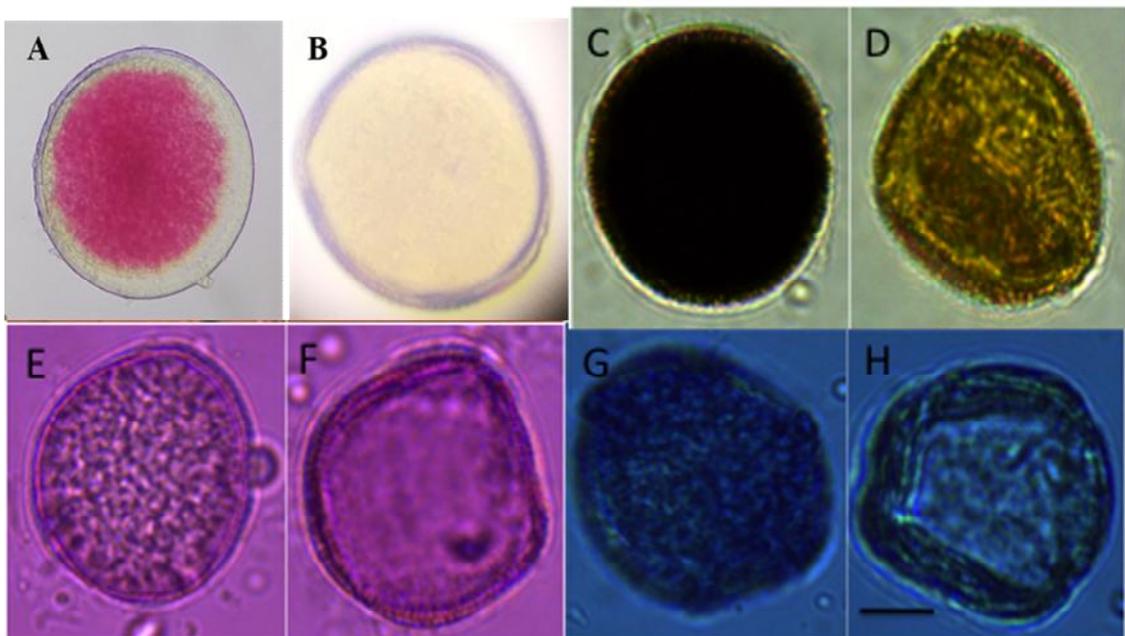


Figura 2. Grãos de pólen de *P. ipecacuanha* obtidos por diferentes métodos colorimétricos. TTC 0,30% A) viável B) inviável. Lugol 1% C) viável D) inviável. Reativo de Alexander E) viável F) inviável. Azul de astra 0,5% G) viável H) inviável. Barra = 10  $\mu$ m

O lugol apresentou taxa de viabilidade de 94,13% (Figura 2E e 2F). Este teste colorimétrico é muito utilizado para estimar a viabilidade polínica de várias espécies, sendo mais indicado para as que possuem pólen amiláceo, pois este método se baseia na reação química entre o iodo e a molécula de amido. A reação positiva ao lugol demonstra a afinidade pelo amido, fornecendo ao pólen viável uma coloração preta azulada (Tiago et al., 2014). Macedo et al. (2016), utilizando o teste

com lugol na determinação da viabilidade polínica de *Alpinia zerumbet*, também encontraram valores alta de viabilidade.

Para o corante reativo de Alexander (verde malaquita + fucsina ácida), a taxa de viabilidade polínica foi de 89,73%. Neste teste o pólen viável adquire coloração diferencial entre exina e protoplasma. A fucsina reage com o protoplasma, o qual adquire coloração rosa, já o verde malaquita possui afinidade com a celulose presente na parede celular corando-a de verde, deste modo pólenes viáveis coram a exine de verde e protoplasma de rosa, enquanto que pólenes inviáveis por não possuírem protoplasma adquirem um tom esverdeado (Alexander, 1980).

A coloração de pólenes inviáveis é de grande valia, já que a utilização de corantes incapazes de corar grãos de pólen inviáveis pode levar a uma superestimação da viabilidade, haja vista que pólenes com paredes celulares mucilaginosas, espessas e com espículas dificultam a penetração e reação do corante, o que pode levar a uma classificação equivocada dos grãos de pólen (Alexander, 1969).

Na análise de botões florais coletados em turnos diferentes observou-se que as anteras coletadas no turno matutino tiveram uma reação rápida com o tetrazólio, obtendo uma coloração rosa/pink instantaneamente após o contato, sendo que o melhor horário para a coleta foi as 08:00 horas. Já os botões coletados no período vespertino demoraram em torno de 2 horas e 30 minutos para obter coloração, tal situação deve estar ligado com o fator climático e maior índice de respiração celular dos grãos de pólen no período matutino, já que o corante, reage com o hidrogênio produzido na respiração celular do pólen, fazendo o grão de pólen adquirir uma coloração diferenciada (Huang et al., 2004). Desta forma quanto maior a taxa de respiração celular, maior é a atividade enzimática da desidrogenase, e disponibilidade de íons hidrogênio livres para reagir com o tetrazólio e formar o formazan que fornece a coloração rosa aos grãos de pólen.

Fatores ambientais também podem interferir na viabilidade polínica quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do grão de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede, pode diminuir a taxa de respiração celular e viabilidade (Sousa, 2002).

Ge et al. (2011) evidenciaram em *Panicum virgatum* L., que o aumento da temperatura e a irradiação ultravioleta-B mostraram interferir negativamente na

viabilidade e longevidade do pólen. Segundo Soares (2010), que analisou a viabilidade de pólen de bananeira em temperatura mais elevada, os valores mais altos de VP foram obtidos às 8h, tal resultado é explicado pelo fato de que nesse horário de coleta o pólen encontra-se em adequado estágio de desenvolvimento fisiológico (imediatamente após a antese), observando-se, portanto, uma redução nos valores dessas variáveis ao longo do dia.

Trabalhos conduzidos por Nunes (2004), com grãos de pólen de flores de atemoeira coletados em diferentes horários, entre 7 horas e 10 horas, e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, indicaram que os grãos de pólen coletados às 7h e inoculados em meio de cultura com concentração de sacarose de 10%, apresentaram maior porcentagem de viabilidade. Resultados semelhantes foram obtidos em *Solanum sessiliflorum* Dunal (Luz et al. 2008) e *Passiflora suberosa* (Cruz et al. 2008). Anormalidades, tais como pólen contraído ou vazio são relatados para plantas de pimenta expostas a alta temperatura e seriam responsáveis pelo decréscimo na viabilidade do pólen e, conseqüentemente, pela baixa produção de sementes (Raja Reddy e Kakani, 2007).

Na avaliação da viabilidade do pólen com uso de tetrazolio a 0,30% foi constatado um valor médio 72,7%. O teste de TTC é um teste rápido e simples, por isso tem sido muito utilizado, além de vários autores relatarem que o teste de TTC é uma estimativa confiável da viabilidade polínica, sendo próxima àquela fornecida pelos testes de germinação in vitro (Mulugeta et al. 1994, Bolat e Pirlak 1999, Huang et al., 2004).

Em trabalho de viabilidade polínica com *Carica papaya* com o uso de TTC, carmim acético, lugol, sudan e Alexander, Munhoz et al (2008), demonstraram que teste com TTC foi o único método colorimétrico que forneceu resultados semelhantes à estimativa de viabilidade polínica dada pelos testes de *germinação in vitro* (67,5%) e, portanto, confiável na avaliação de viabilidade polínica, e ainda supõe que os demais corantes testados superestimaram a viabilidade polínica. Resultados semelhantes foram obtidos em bananeira tetraploides por Soares et al (2010), onde os autores demonstraram que o teste com TTC foi o método colorimétrico que forneceu resultados mais próximos à estimativa de viabilidade polínica dada pelos testes de germinação in vitro.

A viabilidade polínica associada ao comportamento meiótico, pode ser considerado um método rápido e um resultado de partida na avaliação da viabilidade. Uma alta percentagem de grãos de pólen viáveis normalmente é esperada como resultado de um alto porcentual de tétrades normais, esse comportamento reflete a ocorrência de uma meiose regular e indica potencial uso desses acessos em cruzamentos (Corrêa et al. 2005; Pozzobon et al 2015).

## CONCLUSÃO

A população de *P. ipecacuanha* apresenta alto índice meiótico, com valores superiores a 85%, o que indica a ocorrência de uma meiose regular. A taxa média percentual de viabilidade polínica foi alta para a espécie, quando esta é avaliada por diferentes métodos, portanto os indivíduos da população analisada poderão ser utilizados futuramente em programas de melhoramento sem que haja prejuízos.

A utilização do método com lugol 2% e Azul de Astra superestima a viabilidade, recomendando a utilização do Reativo de Alexander, por apresentar fácil distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. E devido à coloração apenas de pólen com atividade respiratória indica-se o TTC 0,30%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, 55:13-18, 1980.

ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and no aborted pollen. **Stain Technology**, 44: 117-122, 1969.

AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera*(Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 55-63, 2006.

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema*(DC.) G.Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. **Bioikos**, 15(1): 39-44, 2001.

- BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Journal of Agriculture and Forestry**, 23:383-388, 1999.
- CORRÊA, M.G.S., VIÉGAS, J., SILVA, J.B., ÁVILA, P.F.V., BUSATO, G.R. e LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Botanica Brasilica**, 19(2), 295-303, 2005.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em semente de soja - Série Sementes. **Circular técnica**, 39: 1- 8, 2007.
- COSTA, A.F. Farmacognosia. 2.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1978. p.614-24.
- CRUZ, T.V.; SOUZA, M.M.; ROZA, F.A.; VIANA, A.J.C.; BELO, G.O.; FONSECA, J.W.S. Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30:875-879, 2008.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; FREITAS-NETO, M.; PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, 63: 229-236, 2010.
- DEFANI-SCOARIZE, M.A. et al. Evolution of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parents. **Maydica**, 40: 319-324, 1995.
- GE, Y.; FU, C.; BHANDAR, I. H.; BOUTON, J.; BRUMMER, E.C.; WANG, Z.Y. Pollen viability and longevity of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Crop Science**, 51(6): 2698–2705, 2011.
- HORNER, H.T., PALMER, R.G. Mechanisms of genic male sterility. **Crop Science**, 35:1527-1535, 1995.
- HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, 93: 295-301, 2004.
- KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Estimativa da viabilidade do pólen com diferentes corantes, em cinco espécies de Urticaceae do Rio Grande do Sul. **Revista Científica Rural**, 10: 23-29, 2005.
- LAUTON, D.S.; SANTOS, A.C.; KARSBURG. I.V.; DAMASIO, J.F. Viabilidade polínica de jasmim manga com corante tetrazólio. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, 8: 34-39, 2016.

LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**,43: 2-6, 1951.

LOVE, R.M. 1949. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**.Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. 23p, 1949.

LUZ, C.L.; SCHUELTER, A.R.; LUZ, C.L.; DALMASO, A.; VIEIRA, E.S.N.; BARRETO, R.R. Germinação in vitro de grãos de pólen e efeito da proteção das plantas na frutificação de cabiu (*Solanum sessiflorum* Dunal). **Acta Scientiarum Agronomy**, 30: 539-545, 2008.

MACEDO, W.A.; SANTOS, B.N.V.; MELLO, V.S.; DAMASIO, J.F.; SANTOS, L.C.B.; LEITE, D.M.; KARSBURG, I.V. Uso de testes colorimétricos na estimativa da viabilidade polínica de alpínia. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, 8: 1-8, 2016.

MACEDO, W.A.; SANTOS, B.N.V.; MELLO, V.S.; DAMASIO, J.F.; SANTOS, L.C.B.; LEITE, D.M.; KARSBURG, I.V. Teste do cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) na viabilidade polínica da colônia. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, 8: 36-42, 2016.

MARTINS, K.C. **Palinologia de *Capsicum spp.*: Caracterização, divergência genética e viabilidade polínica**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010. 112f. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MELLO, V.S.; DAMASIO, J.F.; SANTOS, B.N.V.; MACEDO, W.A.; LEITE, D.M.; SANTOS, L.C.B.; KARSBURG, I.V. Estimativa dos grãos de pólen de resedá rosa em 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB**, 8: 19-24, 2016.

MELLO, V.S.; MIRANDA, D.P.; VIEIRA, A.; DINS, A.T.; KARSBURG, I.V. Indicação de corante para avaliação da viabilidade polínica de *Morinda citrifolia* L.(Rubiaceae). In: I Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Alta Floresta, 2013. **Anais...** Alta Floresta: Unemat, 2013, p.1-5.

MULUGETA, D., MAXWELL, B.D., FAY, P.K. e DYER, W.E. *Kochia (Kochia scoparia)* pollen dispersion, viability and germination. **Weed Science** 42:548-552, 1994.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; FILHO, P. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F.Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botanica**, 31: 209-214, 2008.

NUNES, C.F. 2004 **Polinização artificial e natural de atemóia cultivar "Gefner", viabilidade do grão de pólen e correlação entre comprimento de flor e número de carpelos**. Janaúba: Universidade Estadual de Montes Claros, 2004, 55p.  
(Monografia- Conclusão de Curso.

PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON. M.T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais, São Paulo, 2005. **Anais...** São Paulo: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.24 – 40.

PEÑALOZA, A.D.P.S. Germinação de sementes de *Arachis pintoi* obtidas em condições distintas de multiplicação. In: Reunião Brasileira De Zootecnia, Brasília, v.32, 1995. **Anais...**Brasília: SBT, 1995. p.78-79.

POZZOBON, M.T.; BIANCHETTI, L.B.; SANTOS, S.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**, 13: 96-100, 2015.

RAJA REDDY, K.; KAKANI, V.G. Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. **Scientia Horticulturae**, 112: 130-135, 2007.

SHARMA, A.K; SHARMA, A. **Chromosome techniques**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994, 367 p.

SOARES, T. L.; SANTOS-SEREJO, J. A.; C.; H.; S.; LINS, L. C. R.; O. Viabilidade de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em bananeiras tetraplóides. In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Natal/RN,2010. **Anais....** Natal: Frutas: Saúde, inovação e sustentabilidade, 2010, p.6- 11.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* degener). **Ciência Agrotécnica**, 26: 1209-1217, 2002.

SOUSA, M.P. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: EUFC, 1991. 416p

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Springer-Verlag, Berlin, 1974, 102p.

TEIXEIRA, V. A., COELHO, M.F.B., MING, L. C. Poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stoves]: aspectos da memória cultural dos poaieiros de Cáceres - Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v: 335- 343, 2012.

TIAGO, A.V.; ROCHA, V.D.; TIAGO, P.V.; LIMA, J.S.; ROSSI, A.A.B. Viabilidade polínica e receptividade estigmática em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Enciclopédia Biosfera** 10:19-32, 2014.

YOSHITOME, M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARBURG, I.V 2008. Caracterização dos cromossomos mitóticos e índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.) WILLD. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 7: 21- 28, 2008

### 4.3 GENOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DAS RAÍZES DE *Psychotria ipecacuanha*

#### RESUMO

As plantas com potencial medicinal possuem propriedades terapêuticas e têm sido amplamente utilizadas na medicina popular de forma empírica contra várias patologias, porém a maioria destas plantas não foi suficientemente estudada no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico. O presente estudo avaliou o efeito citotóxico e genotóxico de decocções das raízes de *Psychotria ipecacuanha*, sobre o ciclo celular de *Allium cepa* e *Pisum sativum*. Foram testadas cinco concentrações de decocção das raízes de poaia: 2g/L, 5g/L e 8g/L e cinco tempos de exposição das raízes as decocções: 24, 48, 72, 96 e 120h. Para cada tratamento e para os controles negativo e positivo foram utilizados cinco bulbos de *Allium cepa* e 10 sementes de *Pisum sativum*. Os bulbos foram inicialmente colocados em água destilada e as sementes foram colocadas em placas de Petri forradas com papel germitest e umedecido com água destilada, a fim de estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após os bulbos e sementes enraizarem, os mesmo foram colocados nas soluções teste pelo tempo determinado para cada tratamento. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento com o uso do coranteorceina acética 2%. O índice mitótico foi obtido por meio da divisão do número de células em mitose pelo número total de células e multiplicando-se por 100. Para o cálculo o Valor Limite de Citotoxicidade foi realizado a divisão do índice mitótico da amostra pelo índice mitótico do controle negativo e multiplicado por 100. O valor limite de citotoxicidade demonstrou que os extratos aquosos de *P. ipecacuanha*, quando usados em altas concentrações ou por longo período, possuem efeitos letais ou subletais. As principais alterações cromossômicas encontradas foram: cromossomos perdidos e micronúcleo. As decocções das raízes de *P. ipecacuanha* possuem efeito genotóxico, uma vez que todas as concentrações causaram alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepa* e *Pisum sativum*, e causou um efeito inibitório no ciclo celular dos dois bioindicadores testados, o que demonstra possuir um efeito citotóxico e antiproliferativo.

**Palavras-chave:** efeito citotóxico, antiproliferativo e *Allium cepa*.

## GENOTYPICITY, CYTOTOXICITY AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF EXTRACTS OF THE ROOTS OF *Psychotria ipecacuanha*

### ABSTRACT

Plants with medicinal potential have therapeutic properties and have been widely used in folk medicine empirically against various pathologies, but most of these plants have not been sufficiently studied for their cytotoxic/mutagenic potential. The present study evaluated the cytotoxic and genotoxic effect of decoctions of the roots of *Psychotria ipecacuanha* on the cell cycle of *Allium cepa* and *Pisum sativum*. Five decoction concentrations of roots were tested: 2g / L, 5g / L and 8g / L and five roots exposition times for the decoctions: 24, 48, 72, 96 and 120h. For each treatment and for the negative and positive controls, five bulbs of *Allium cepa* and 10 seeds of *Pisum sativum* were used. The bulbs were initially placed in distilled water and the seeds were placed in Petri dishes lined with germitest paper and moistened with distilled water in order to stimulate the development of the meristem root. After the bulbs and seeds were rooted, they were placed in the test solutions by the time determined for each treatment. The slides were prepared by the crushing technique using the acetic orcein 2% dye. The mitotic index was obtained by dividing the number of cells in mitosis by the total number of cells and multiplying by 100. To calculate the Cytotoxicity Limit Value, the mitotic index of the sample was divided by the mitotic index of the negative control and multiplied by 100. The limit value of cytotoxicity has shown that aqueous extracts of *P. ipecacuanha*, when used in high concentrations or for long period, have lethal or sublethal effects. The main chromosomal alterations were: lost chromosomes and micronucleus. The decoctions of *P. ipecacuanha* roots have a genotoxic effect, since all concentrations caused chromosomal alterations in the cell cycle of *Allium cepa* and *Pisum sativum*, and cause an inhibitory effect on the cell cycle of the two bioindicators tested, which demonstrates an effect cytotoxic and antiproliferative.

**Key words:** cytotoxic, antiproliferative and *Allium cepa*.

## INTRODUÇÃO

As plantas com potencial medicinal possuem propriedades terapêuticas e têm sido amplamente utilizadas na medicina popular de forma empírica contra várias patologias, sendo, algumas vezes, o único medicamento disponível à população. O uso de plantas medicinais vem crescendo gradativamente, devido a vários fatores, como o baixo poder aquisitivo da população e seu custo reduzido. Cerca de 60-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional dependem essencialmente de plantas para cuidar de sua saúde (Fachinetteo Tedesco, 2009; Dias et al., 2014; Silva et al., 2015).

A maioria das plantas usadas como fonte de chás e infusões para tratamentos de enfermidades não foram suficientemente estudadas, no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico, podendo estes chás e infusões conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos, o que acarreta em danos à saúde. Tais efeitos podem ser monitorados pelo uso de testes com bioindicadores, como o sistema teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum*. Os bioindicadores são úteis e podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico (Silva et al., 2003; Vicentini et al., 2001; Bagatini, 2007).

O sistema teste de *Allium cepa* destaca-se entre os testes citogenéticos aplicados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais por ser uma alternativa barata e eficiente. O teste consiste em avaliar alterações na divisão celular por meio da avaliação de danos cromossômicos, distúrbios no ciclo celular e índice mitótico de células meristemáticas de cebola (Sampaio et al., 2012; Silva et al., 2015).

Mello et al. (2014) relatam o uso do bioindicador *Pisum sativum*, o qual possui germinação rápida e mostra ser sensível a alterações no meio, podendo desta forma ser utilizado para os estudos dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção de genotoxicidade, porém, ainda são poucos os relatos sobre tal bioindicador.

*Psychotria ipecacuanha* é uma planta medicinal pertencente à família Rubiaceae, em suas raízes são produzidos dois alcalóides de grande valor farmacológico: a emetina e a cefalina, que apresentam efeito emético considerável e expectorante em doses atenuadas. É amplamente utilizada na medicina popular,

para o tratamento de malária, doenças respiratórias, gastrite, disenteria, verme, câncer, denteição e vomitivo (Souza et al., 2013; Reis et al., 2004).

Estudos com gêneros da família Rubiaceae apontam que espécies dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria* apresentam extratos e frações com potencial citotóxico (Pessoa, 2009). A maioria dos trabalhos sobre a ipecacuanha é relacionada aos estudos farmacológicos, não havendo relatos de estudos citotóxicos e mutagênicos, deixando desta forma lacunas sobre dados que assegurem o seu uso como forma de tratamento para enfermidades, sem que haja prejuízo para a saúde.

Devido ao uso medicinal e importância, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico e genotóxico de decocções das raízes de *Psychotria ipecacuanha*, em três concentrações e cinco tempos de exposição, sobre o ciclo celular de *Allium cepae* *Pisum sativum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Alta Floresta – MT,

### Área de estudo e material de coleta

Para os testes de genotoxicidade e citotoxicidade utilizou-se raízes secas de *Psychotria ipecacuanha*, provenientes de uma população natural situada no município de Denise (S 14°39' e W 57°05'), Mato Grosso.

### Montagem do experimento

Foram utilizados bulbos de *Allium cepa* e sementes de *Pisum sativum* adquiridos no comércio local, e raízes secas de *Psychotria ipecacuanha* para obtenção de decocção que formaram os tratamentos. Os tratamentos foram constituídos de três concentrações: 2g/L, 5g/L e 8g/L, e cinco horários de exposição das raízes a decocção: 24h, 48h, 72h, 96h e 120h.

Para obtenção das decocções as raízes foram trituradas e pesadas de acordo com a concentração de cada tratamento, posteriormente foram levadas ao fogo em 1 litro de água da torneira, deixando ferver por 10 minutos. Após procedeu-se a coagem da decocção e deixou-se em repouso até esfriar, como recomendado por populares que fazem o uso da planta medicinal.

Para os testes, foram utilizados cinco bulbos de cebola e 10 sementes de ervilha para cada tratamento e para os controles negativos e positivos. O controle negativo constituiu de bulbos e sementes germinados e tratados em água destilada, enquanto que o controle positivo constituiu de bulbos e sementes germinados em água e tratados em solução de paracetamol a 0,2%.

Os bulbos foram colocados em copos plásticos descartáveis (10 mL) para o enraizamento das cebolas. A água foi trocada a cada 24 horas. Para a germinação, as ervilhas foram colocadas em placa de petri forrada com papel Germitest e acondicionadas em câmara de germinação (BOD) com ambiente controlado a uma temperatura de 25° C.

Após a germinação e as raízes atingirem 1cm de comprimento, os bioindicadores receberam as decocções e as coletas foram realizadas de acordo com os tempos determinados para cada tratamento. As raízes coletadas foram lavadas em água destilada e posteriormente fixadas em solução de metanol: ácido acético na proporção de 3:1 e acondicionadas em refrigerador até o momento de preparo das lâminas.

### **Preparo das lâminas**

No momento do preparo as raízes foram lavadas em água destilada por 15 minutos, realizando-se 3 lavagens, tais lavagens tem por finalidade realizar a retirada do fixador do citoplasma da célula, a fim de que o corante consiga reagir perfeitamente com as células.

Para a hidrólise das células foi utilizado HCl 5N, as raízes da cebola ficaram expostas ao ácido por 11 minutos, enquanto que as da ervilha necessitaram de 15 minutos. Ao término desse processo, foram lavadas novamente conforme o procedimento anterior.

Para os preparo das lâminas procedeu-se o método de esmagamento com o uso do coranteorceina acética 2%, para tanto utilizou se uma radícula por lâmina, sendo analisadas duas radículas por bulbo. As radículas foram dispostas sobre a lâmina de microscopia, sendo a região meristemática (identificada pela coloração esbranquiçada) seccionada com o auxílio de um bisturi. Ao material em plena atividade celular foi acrescentado uma gota do corante, sendo realizada esmagamento do material com o bastão de vidro. Após o material foi coberto com a lamínula e o excesso do corante foi retirado com papel filtro (Guerra et al., 2003; Galvão, 2008).

As lâminas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico (LEICA) com a objetiva de 40X, na qual se observou células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase e a possível ocorrência de alterações cromossômicas durante o ciclo celular. Foram analisadas 10 lâminas por tratamento, 500 células por lâmina, perfazendo um total de 5000 células por tratamento.

O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100 (Oliveira et al., 1996; Pires et al., 2001). As imagens de interesse (anomalias) foram fotografadas com o uso de objetiva de 100X em um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e software LAZ EZ V1. 7.0.

Para o cálculo do Valor Limite de Citotoxicidade foi realizado a divisão do índice mitótico do tratamento pelo índice mitótico do controle negativo e multiplicando-se por 100 (Migid et al., 2007).

Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variância, sendo realizada transformação dos dados quando necessário. Uma vez que foram atendidas às pressuposições estatísticas, foi realizada à análise de variância e, para as causas de variações significativas, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa Estatístico Sisvar® (Ferreira, 2011). Para a comparação entre as concentrações foi realizada pelo teste de regressão à 5% de probabilidade com o auxílio do software Sigmaplot® 11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teste *Allium cepa*

Na análise das células normais a fase de interfase é a que obteve a maior quantidade de células, tendo valores variando de 27,80 no tratamento 8 g.L<sup>-1</sup>/ 120h á 481 células para o tratamento de 5 gL<sup>-1</sup>/120h. Obseva-se que os menores tempos de exposição e concentração foram os que obtiveram as maiores quantidade de células normais em interfase (Figura 1A). A ocorrência de um número alto de células em interfase como observados nos vários tratamentos analisados, podem indicar um efeito antiproliferativo dos extratos sobre a divisão celular (Faschineto et al., 2007).

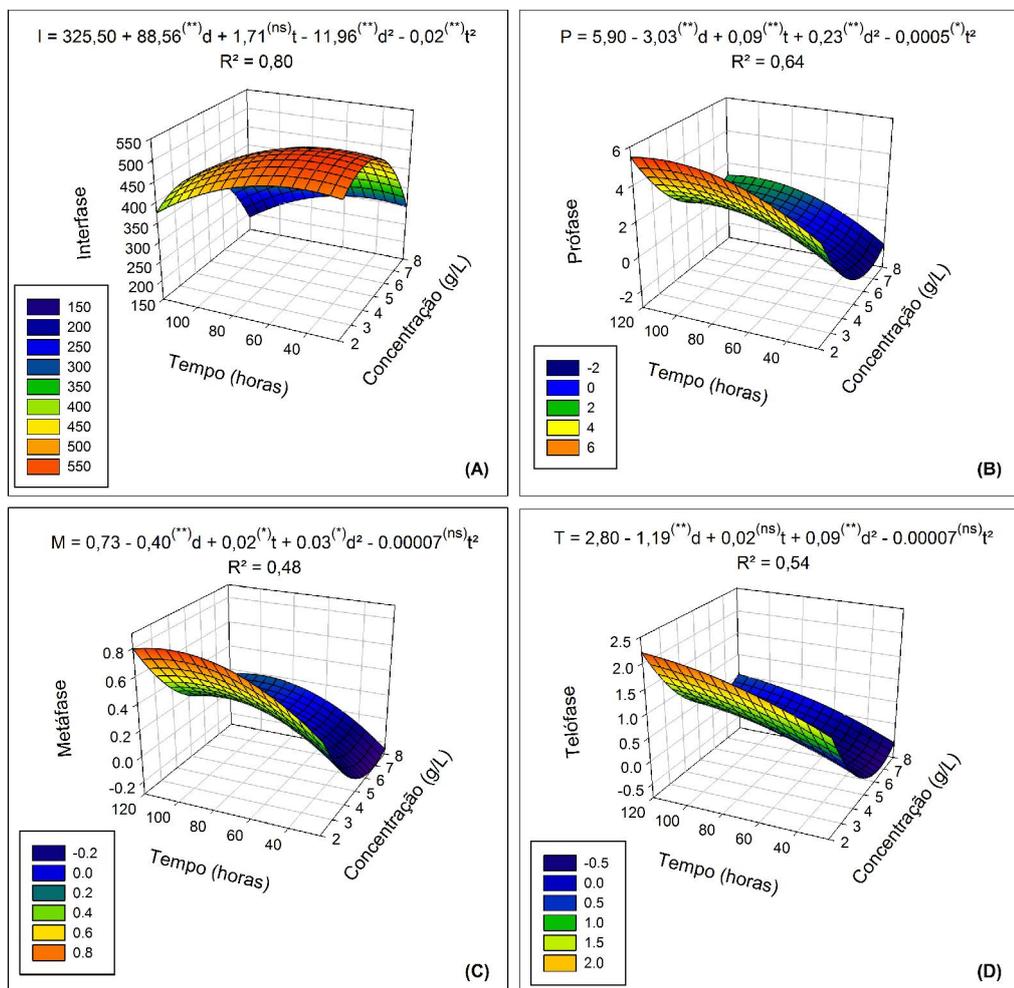


Figura 1. Divisões normais do Ciclo celular de *Allium cepa* tratada com decoção de raízes de *Psychotria ipecacuanha*. Em (A) células em interfase, (B) em prófase, (C) em metáfase e (D) em telófase.

Quanto à mitose normal, na prófase, metáfase e telófase, a maior quantidade de células nestas fases foi encontrada para os tratamentos com menor concentração e maiores tempos de exposição (Figura 1). Para a anáfase os maiores valores foram encontrados para o controle negativo, não diferindo do tratamento 2g/L<sup>-1</sup>/96h (Tabela1). As concentrações de 5g/L e 8g/L foram iguais ao controle positivo, deste modo é possível que a alta concentração de alcaloides encontradas nas raízes da poaia, acentuou o efeito antiproliferativo nos tratamentos com doses maiores. Tal resultado também foi observado em outras plantas usadas como fontes medicinais, como em: *Phyllanthus niruri* L., *Punica granatum* e *Achyrocline satureioides*, onde quanto maior a dose dos extratos maior foi o efeito antiproliferativo observado (Neves et al., 2014; Kuhn et al., 2015; Fachinnetto et al., 2007).

Tabela 1. Anáfases normais obtidas do tratamento em diferentes doses e horários de exposição à decocção de raízes de *Psychotria ipecacuanha* (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ )

Concentração	Tempo	Divisão Normal
		Anáfase
C. Negativo	24h	1,60 a
C. Positivo	24h	0,00 b
2g/L	24h	0,00 b
	48h	0,10 b
	72h	0,30 b
	96h	0,60 ab
	120h	0,40 b
5g/L	24h	0,00 b
	48h	0,00 b
	72h	0,00 b
	96h	0,20 b
	120h	0,00 b
8g/L	24h	0,00 b
	48h	0,00 b
	72h	0,00 b
	96h	0,00 b
	120h	0,00 b
CV (%)		19,57

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Nos dados das divisões anormais os maiores valores foram encontrados para a interfase, tendo valores variando de 0,0 para o controle negativo a 464,10 para a concentração de 8g/L no tempo de 120h. O tratamento com 120 horas de exposição, na concentração de 8g/L apresentou um maior número de interfases anormais, demonstrando que tal tratamento nesta concentração possui alto efeito antiproliferativo e mutagênico (Figura 2).

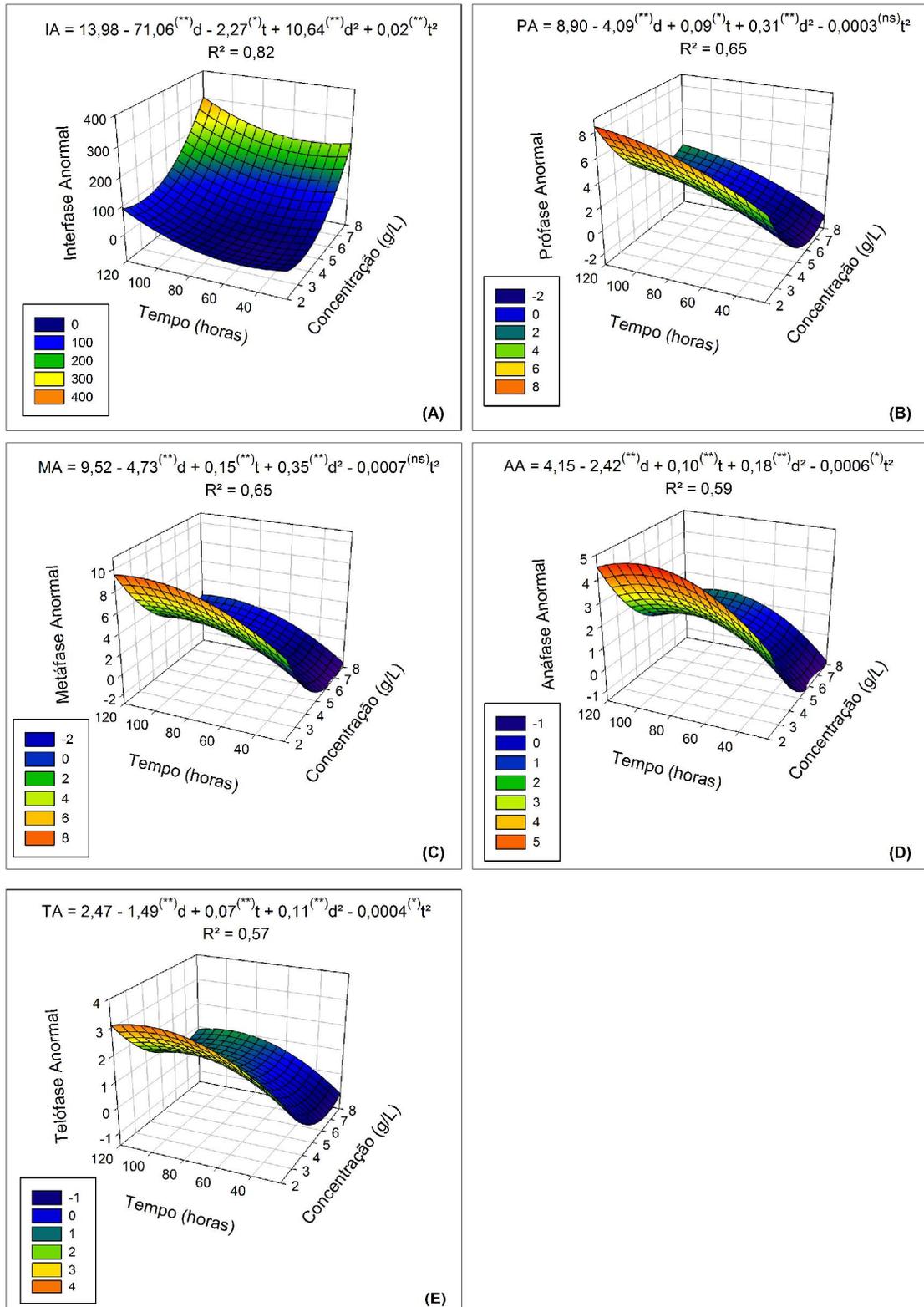


Figura 2. Divisões anormais do Ciclo celular de *Allium cepa* tratada com decoção de raízes de *Psychotria ipecacuanha*. Em (A) células em interfase, (B) em prófase, (C) em metáfase, (D) em anáfase e (E) em telófase.

Quanto a mitose anormal, observa-se que para todas as fases da divisão celular, os tratamentos com menor concentração ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) e maiores tempos de exposição (96h e 120h) obtiveram os maiores valores, superando os valores do controle positivo. Tal comportamento deve estar ligado a inibição do ciclo celular nas concentrações maiores o que leva a um menor número de células em divisão celular e uma diminuição nas alterações na fase da mitose, no entanto ocasiona um aumento no número de células em interfase e no efeito antiproliferativo.

Na análise da porcentagem de células anormais, os tratamentos demonstraram possuir um efeito de dose dependência, ocasionando um aumento de células com irregularidades, conforme a elevação na concentração e tempo de exposição (Figura 3), sendo que apenas os tratamentos  $5\text{g.L}^{-1}/72\text{h}$ ,  $5\text{g.L}^{-1}/120\text{h}$  não diferiram do controle negativo, os demais obtiveram valores estatisticamente iguais ou superiores ao controle positivo (Tabela 2). Estes valores altos de alterações encontrados no ciclo celular de *Allium cepa* no presente estudo podem indicar a genotoxicidade dos extratos das raízes de poaia. Os tratamentos com extratos de raízes de poaia apresentaram aumento significativo da porcentagem de alterações cromossômicas quando comparados ao controle em água destilada, demonstrando potencial genotóxico, e aqueles que não possuem tal efeito, apresentaram efeito antiproliferativo.

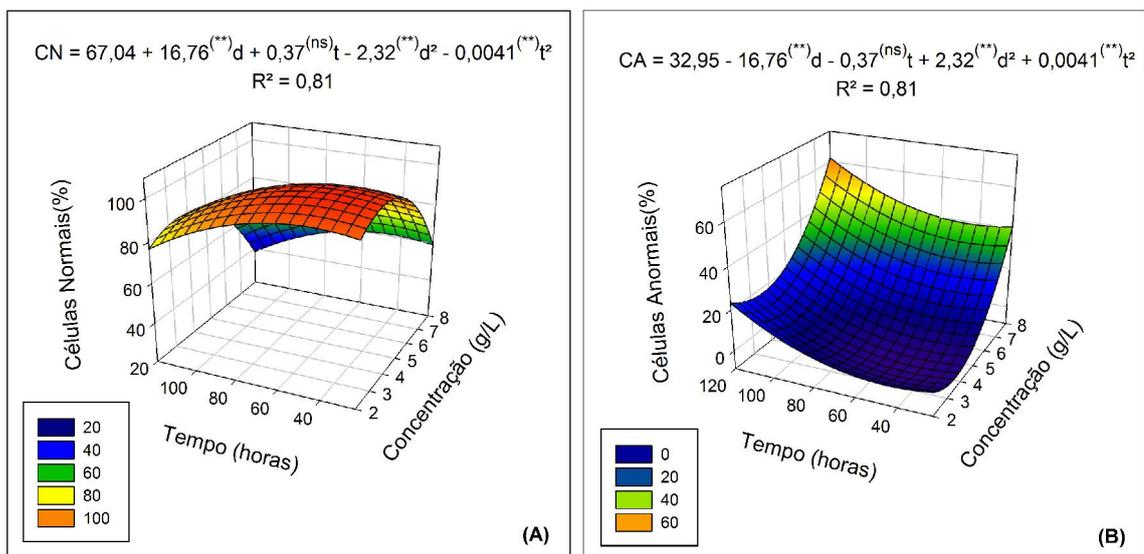


Figura 3. Porcentagem de células normais (A) e anormais (B), no ciclo celular *A. cepa*, tratadas com decocções de raiz de *P. ipecacuanha*, em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Tabela 2. Porcentagem de células normais e anormais, índice mitótico (IM) e Valor Limite de Citotoxicidade (VLC), do ciclo celular de *Allium cepa* exposta a diferentes doses e horários de exposição de decoção de raízes de *Psychotria ipecacuanha* (dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ )

Dose	Tempo	Total de Células	C. Normais (%)	C. Anormais (%)	I.M.	VLC (%)
<b>C. Negativo</b>	24h	5000	100,00 a	0,00 g	4,02 a	100
<b>C. Positivo</b>	24h	5000	93,92 a	6,08 ef	0,64 cd	15,92
<b>2g/L</b>	24h	5000	95,18 a	4,82 ef	0,24 d	5,97
	48h	5000	94,28 a	5,72 ef	0,78 bcd	19,40
	72h	5000	91,80 a	8,20 ef	1,78 b	44,27
	96h	5000	87,44 ab	12,56 de	3,00 a	74,62
	120h	5000	91,18 ab	8,82 ef	1,58 bc	39,30
<b>5g/L</b>	24h	5000	91,90 a	8,10 ef	0,00 d	0,0
	48h	5000	92,58 a	7,42 ef	0,08 d	1,99
	72h	5000	95,28 a	4,72 efg	0,12 d	2,98
	96h	5000	91,60 a	8,40 ef	0,30 d	7,46
	120h	5000	96,38 a	3,62 fg	0,18 d	4,47
<b>8g/L</b>	24h	5000	68,58 c	31,42 c	0,00 d	0,0
	48h	5000	76,58 bc	23,42 cd	0,00 d	0,0
	72h	5000	65,16 c	34,84 bc	0,00 d	0,0
	96h	5000	50,54 d	49,46 b	0,04 d	0,99
	120h	5000	6,04 e	93,96 a	0,48 d	11,94
<b>CV (%)</b>			6.22	23.51	17.83	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Dados como índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (Gadano et al., 2002; Tedesco, 2012). No presente estudo os valores do índice mitótico (Tabela 2, Figura 4), variaram de 0,0 para os tratamentos: 5g.L-1/24h, 8g.L-1/24h, 8g.L-1/48h, 8g.L-1/72h a 4,02 para o controle negativo. Todos os tratamentos com a decoção de poaia diferiram do controle negativo. Os tratamentos da concentração de 5g/L e 8g/L em todos os horários de exposição e os de 2g/L nos tempo de 48h,72h e 120h não

diferiram do controle positivo, confirmando que em altas concentrações ou maiores tempos de exposição, os extratos analisados causam uma inibição do ciclo celular, demonstrando possuir efeito antiproliferativo. Os agentes antiproliferativos podem ser detectados, citologicamente pela inibição do ciclo celular e interrupções do ciclo em metáfases (Vieira, 1997).

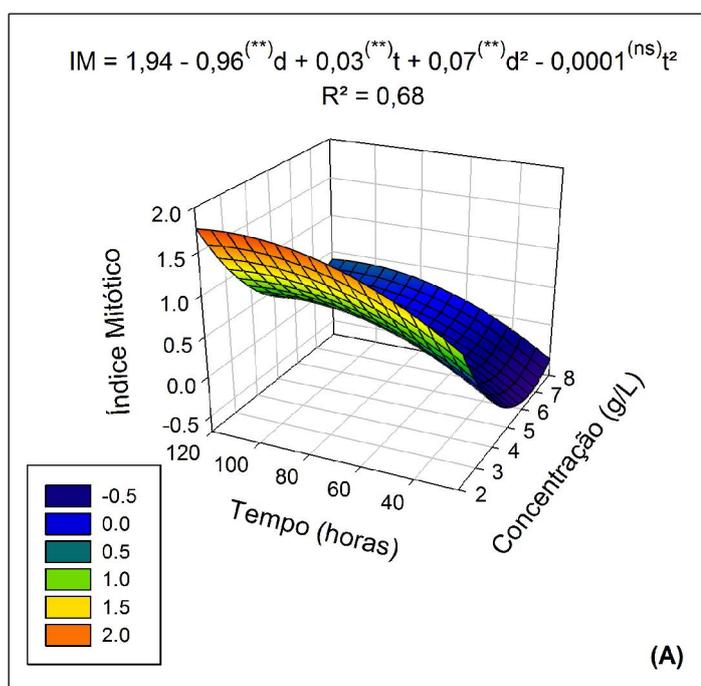


Figura 4. Índice mitótico do ciclo celular de *A. cepa*, exposto a diferentes concentração e tempo de exposição a decocção de raízes de *P. ipecacuanha*.

O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado à identificação e ao monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (Noldin et al., 2003). Segundo Fiskesjö (1995), mesmo que o metabolismo vegetal seja diferente do metabolismo animal, o sistema teste de *Allium cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica, e de observações da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com dados da literatura descritos para o gênero *Psychotria*, como os descritos por Lubini et al., (2008), que em estudos com *P. myriantha* e *P. leiocarpa*, demonstraram que tais espécies apresentam potencial antiproliferativo, sendo este dependente da

concentrações, sendo os maiores potenciais encontrados para concentrações maiores.

### Ensaio com bioindicador *Pisum sativum*. L

Para o bioindicador *Pisum sativum*. L observa-se que a maior parte das células encontrava-se em interfase, sendo os menores valores encontrado para o tratamento 2g.L<sup>-1</sup>/24h com 404,80 células e os maiores para o 8g.L<sup>-1</sup>/96h e 8g.L<sup>-1</sup>/120h (Figura 5). O aumento da concentração e tempo de exposição ocasionou um maior aparecimento de células em interfase, o que pode ser efeito do aumento da quantidade de compostos como os alcaloides existentes nas raízes da poaia.

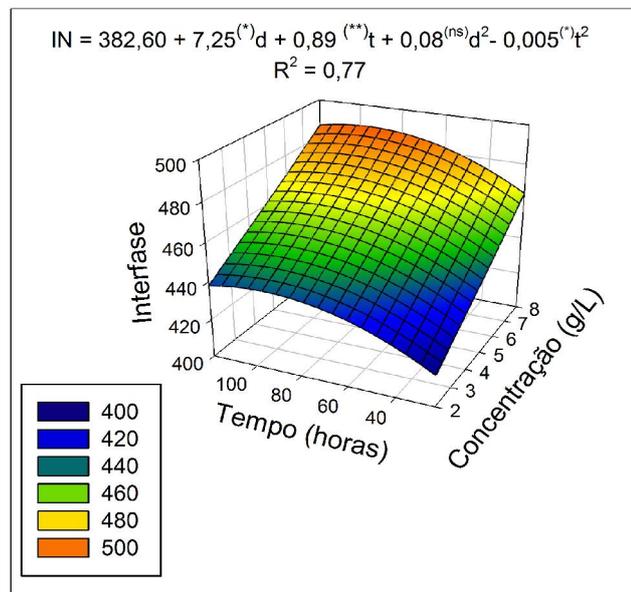


Figura 5. Número de células em interfase do ciclo celular de *Pisum sativum*, exposto a diferentes concentrações e tempo de exposição a decocção de raízes de *P. ipecacuanha*.

A análise da mitose revelou que a menor concentração (2g/L) teve maiores quantidades de células em divisão mitótica enquanto a concentração de 8g/L obteve os menores valores (Figura 6 A e 6B, Tabela 3). Esta inibição do ciclo celular pode ser efeito da ação enzimática presente em substâncias existentes nos extratos vegetais, no caso de *Psychotria ipecacuanha* pode estar ligado à grande quantidade de alcaloides existentes em suas raízes, sendo que tais substâncias têm variações sazonais em suas quantidades (Teixeira et al., 2003).

Tabela 3. Ciclo celular de *Pisum sativum*. L. com divisões normais e anormais obtidas do tratamento em diferentes doses e horários de exposição á decoção de raiz de *Psychotria ipecacuanha* (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ )

Dose	Tempo	Divisões Normais		Divisões Anormais		
		Anáfase	Telófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
C.Negativo	24h	0,50 ab	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
C.Positivo	24h	0,00 a	0,90 abc	5,30 abcd	3,20 abcd	1,00 bc
2g/L	24h	0,60 ab	1,80 ab	8,10 a	4,00 ab	0,20 abc
	48h	0,20 a	0,60 abc	3,10 abcd	2,80 abcd	0,70 c
	72h	1,50 a	1,90 a	6,10 ab	6,30 a	3,30 ab
	96h	0,00 a	0,00 c	0,20 d	0,00 d	1,70 c
	120h	0,00 a	0,20 bc	1,60 cd	0,50 d	0,40 c
5g/L	24h	0,10 a	0,20 bc	0,20 d	0,80 d	0,20
	48h	0,20 a	0,20 bc	2,20 bcd	2,40 bcd	2,10 abc
	72h	0,00 a	0,20 bc	1,40 cd	1,00 cd	0,70 c
	96h	0,10 a	0,00 c	1,10 cd	1,10 cd	1,00 bc
	120h	0,60 ab	0,40 abc	4,40 abc	4,30 abc	3,40 a
8g/L	24h	0,00 a	0,00 c	0,20 d	0,60 d	0,20 c
	48h	0,00 a	0,00 c	0,90 cd	1,00 cd	0,20 c
	72h	0,00 a	0,00 c	1,20 cd	0,50 d	0,30 c
	96h	0,00 a	0,00 c	0,20 d	0,50 d	0,10 c
	120h	0,00 a	0,00 c	0,80 cd	0,60 d	0,70 c
CV (%)		22,93	27,35	45,02	35,91	31,60

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

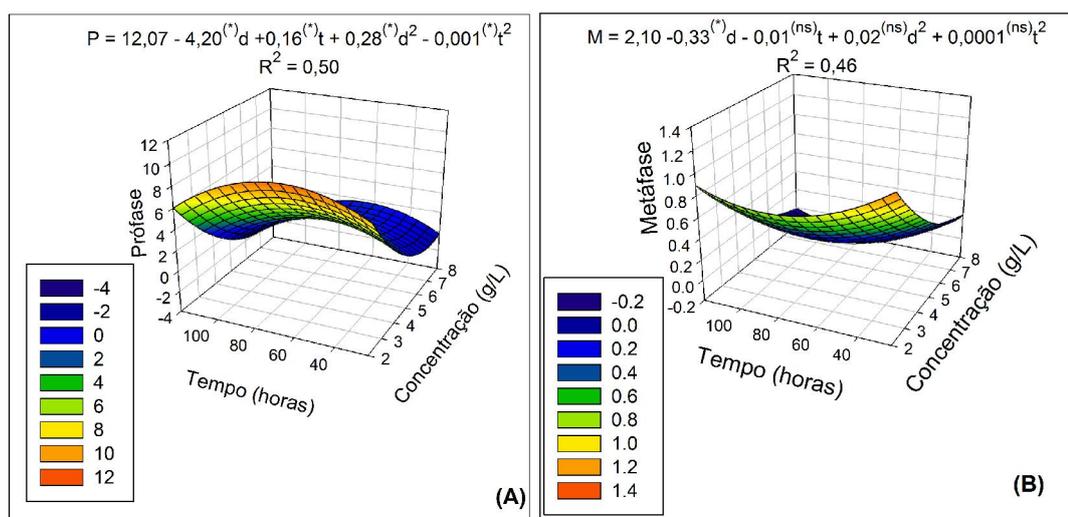


Figura 6. Células em prófase (A) e metáfase (B), do ciclo celular de *Pisum sativum*, exposto a diferentes concentração e tempo de exposição a decoção de raízes de *P. ipecacuanha*.

Quanto as células anormais, a maioria dos tratamentos analisados foram iguais ou superiores estatisticamente ao controle positivo, evidenciando que as decoções de poaia, causaram alterações no ciclo celular, demonstrando possuir um efeito mutagênico (Tabela 4). A porcentagem das células anormais variou de 0,00 para o controle negativo a 16,96 para o tratamento de 2g.L<sup>-1</sup>/24h (Tabela 4). O potencial citotóxico e mutagênico de muitos compostos químicos pode ser monitorado pelo sistema teste com vegetais, que são métodos simples, rápidos e menos onerosos (Bagatinil et al., 2007; Ma et al., 1995).

Tabela 4. Porcentagem de células normais e anormais, índice mitótico (IM) e Valor Limite de Citotoxicidade (VLC), do ciclo celular de *Pisum sativum*. L. exposta a diferentes doses e horários de exposição de decoção de folhas de *Psychotria ipecacuanha* (dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ )

Dose	Tempo	Total de Células	C. Normais (%)	C. Anormais (%)	I.M.	VLC (%)
C. Negativo	24h	5000	100,00 a	0,00 i	6.84 a	100
C. Positivo	24h	5000	93.92 bcde	6.08 defg	0.64 cde	9,35
2g/L	24h	5000	83.04 g	16.96 a	2.08 bcd	30,40
	48h	5000	89.54 ef	10.46 bc	3.06 bc	44,73
	72h	5000	90.48 def	9.52 bcd	4.26 ab	62,28
	96h	5000	90.68 def	9.32 bcd	0.26 de	3,80
	120h	5000	89.48 ef	10.52 bc	1.00 cde	14,61
5g/L	24h	5000	87.88 f	12.12 ab	0.14 de	2,04
	48h	5000	92.58 cde	7.42 cdef	0.62 cde	9,06
	72h	5000	92.90 cde	7.10 cdefg	0.48 de	7,01
	96h	5000	91.98 cdef	8.02 bcde	0.32 de	4,67
	120h	5000	93.04 cde	6.96 cdefg	0.88 cde	12,86
8g/L	24h	5000	95.02 bcd	4.98 efg	0.08 de	1,16
	48h	5000	95.50 abc	4.50 efgh	0.06 de	0,87
	72h	5000	96.20 abc	3.80 gh	0.10 de	1,46
	96h	5000	98.06 ab	1.94 hi	0.00 e	0
	120h	5000	96.16 abc	3.84 fgh	0.00 e	0
CV (%)			1.61	16.48	30.23	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Para a interfase anormal observa-se que os tratamentos nas menores concentrações e tempos de exposição apresentaram um maior efeito genotóxico, ocasionando um aumento dos números de interfases anormais. Já para a prófase anormal os valores intermediários de concentração e tempo se mostraram menos prejudiciais ao ciclo celular quando comparado aos demais tratamentos (Figura 7). Agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula de DNA, tais alterações podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, mas, quando não reparadas ou reparadas erroneamente, originam mutações gênicas e cromossômicas (Umbuzeiro e Roubicek, 2003; Siddiqui et al., 2011). Na literatura encontram-se vários trabalhos sobre a mutagenicidade de extratos vegetais, como os realizados com: *Croton lechleri* (Müll. Arg), *M. recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Bauhinia candicans* Benth. (Camparato et al., 2002; Vieira et al., 2009).

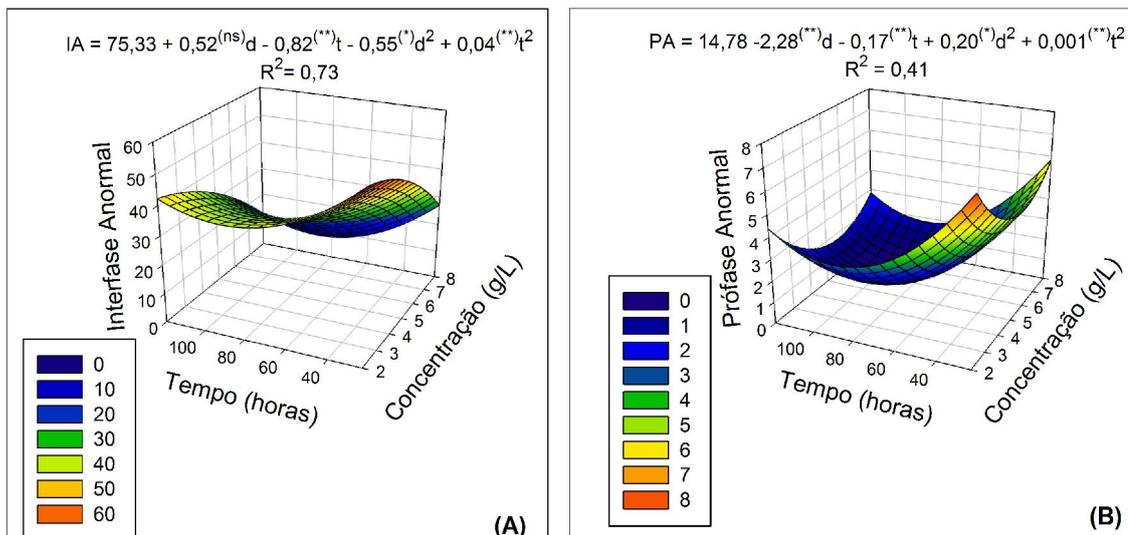


Figura 7. Número de células em interfase (A) e prófase (B) anormais, do ciclo celular de *Pisum sativum*, exposto a diferentes concentração e tempo de exposição a decocção de raízes de *P. ipecacuanha*.

O índice mitótico variou entre 0,00% a 4,26% nos tratamentos com decocções, sendo que o tratamento negativo apresentou um índice de 6,84%, indicando desta forma uma inibição do ciclo celular nas concentrações analisadas (Tabela 5, Figura 8). O índice de divisão mitótica apresentou diferença entre os tratamentos, o que pode indicar uma distinta ação fisiológica de cada um dos extratos aplicados a ervilha. Em estudos com *P. birotula* e *P. brachypoda*, Frescura (2012) observou que os extratos destas espécies possuem um potencial inibitório da

divisão celular, fazendo com o índice mitótico tivesse um decréscimo em concentrações maiores.

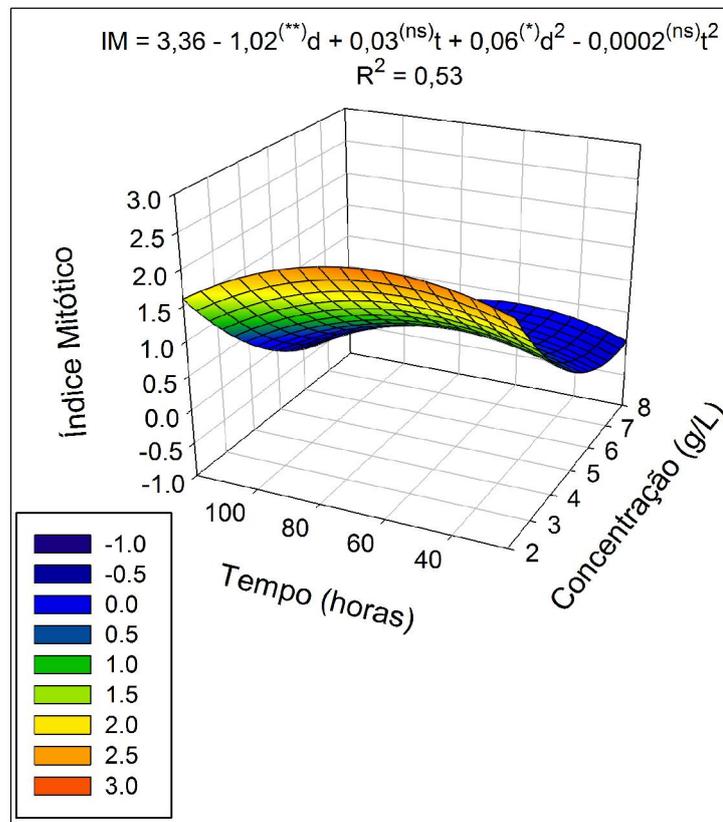


Figura 8. Índice mitótico do ciclo celular de *Pisum sativum*, exposto a diferentes concentração e tempo de exposição a decocção de raízes de *P. ipecacuanha*.

O valor limite de citotoxicidade demonstrou que os extratos aquosos de *P. ipecacuanha*, quando usados em altas concentrações ou por longo período, possuem efeitos letais ou subletais. Os valores variaram de 0,0% para os tratamentos 5g.L<sup>-1</sup>/24h, 8g.L<sup>-1</sup>/24, 8g.L<sup>-1</sup>/48, 8g.L<sup>-1</sup>/72h a 100% no controle negativo, para o bioindicador *Allium cepa*. Já para *Pisum sativum* as variações foram de 0,00% para 8g L<sup>-1</sup>/96 e 8g L<sup>-1</sup>/120 a 100% no controle negativo (Figura 9). Um extrato pode ser considerado letal para valores de limite de citotoxicidade abaixo de 22% em relação ao controle negativo, e subletal para valores com redução abaixo de 50% (Migid et al. 2007).

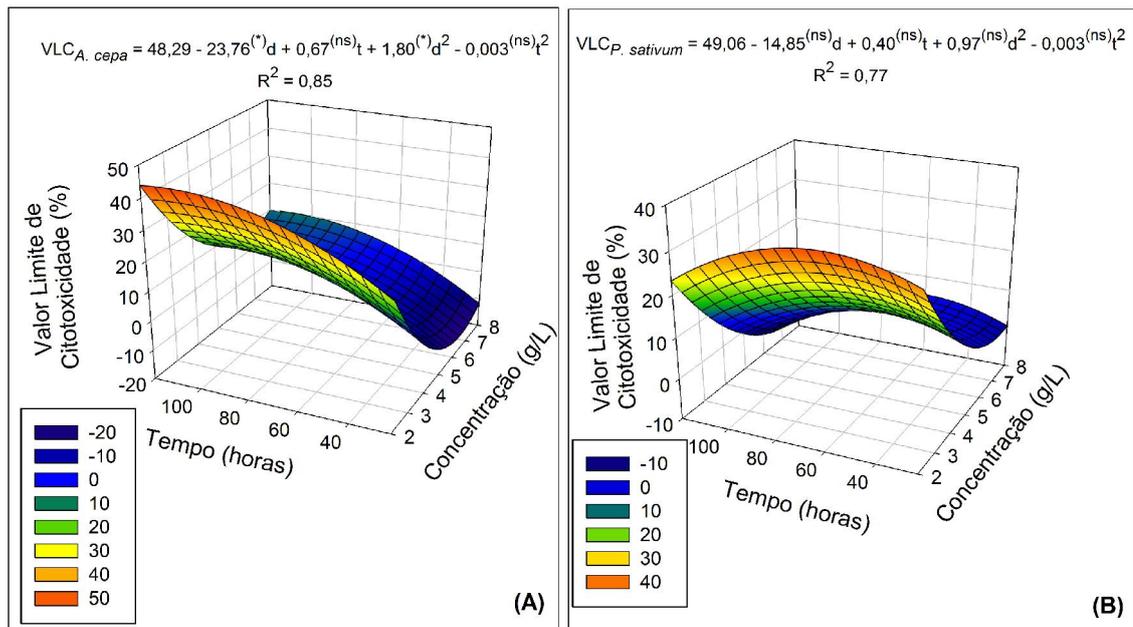


Figura 9. Valor limite de citotoxicidade (%) em células meristemáticas de *Allium cepa*(A) e *Pisum sativum*(B).

Na análise das alterações celulares a maior quantidade de anormalidades encontradas para ambos os bioindicadores foi do tipo cromossomo isolado, seguido pela formação de micronúcleos. Micronúcleos são semelhantes ao núcleo em forma, estrutura e propriedades de coloração, e podem variar grandemente em tamanho, são resultado da perda de cromossomos inteiros ou de fragmentos de cromossomos, resultantes da ação de agentes tóxicos ou genotóxicos que danificam diretamente o cromossomo, ou afetam o fuso. Quando tais fragmentos não se orientam para o núcleo da nova célula ficam isolados no citoplasma, formando a própria membrana nuclear, originando os micronúcleos mitóticos (El-Shahaby, 2003; Andrade et al., 2005). Deste modo, o alto número de células com cromossomos isolados pode ter ocasionado a formação da grande quantidade de micronúcleos observados no presente trabalho.

Também foram observadas células em apoptose, tanto para o bioindicador *Allium cepa* (Figura 10) quanto para *Pisum sativum* (Figura 11). Agentes indutores de estresse, tais como: radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, extratos vegetais, podem causar uma perturbação e levar a uma sequência complexa de evento, que podem induzir a morte celular, tanto por apoptose como por necrose (Kwankua et al., 2010; Mello et al., 2001).

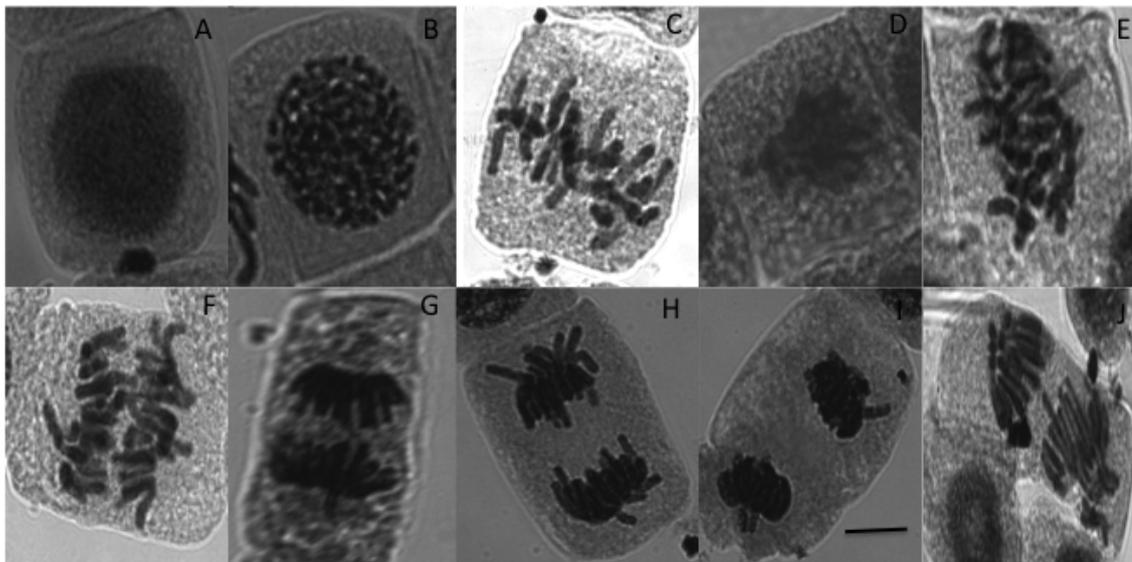


Figura 10. Células em divisão mitótica de *Allium cepa* expostas a diferentes tempos e concentrações de decocções de raízes de *P. ipecacuanha*. A) Interfase com micronúcleo. B) profase normal. C) metáfase com formação de dois blocos de cromatides. D) metáfase com cromossomos isolado. E) anáfase normal. F) anáfase com retardo de cromatides em ambos blocos formados. G) telófase normal. H) telófase com cromatide fora do polo. I) telófase com atraso de cromatide. J) telófase com ponte cromossomica e atraso de cromatides na separação dos blocos cromossomicos. Barra = 10 µm.

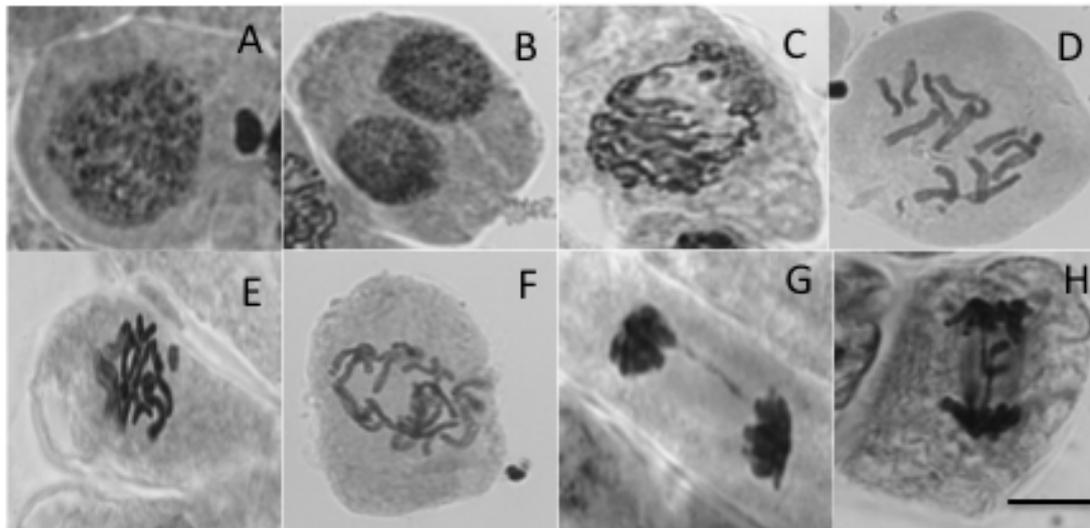


Figura 11. Células em divisão mitótica de *Pisum sativum* expostas a diferentes tempos e de decocções de raízes de *P. ipecacuanha*. A) interfase com micronúcleo. B) interfase binucleada. C) prófase com formação de dois blocos de cromossomos. D) metáfase normal. E) metáfase com cromossomos isolado. F) anáfase com separação desigual das cromatides homologas. G) telófase com ponte de cromatina. H) telófase com formação de ponte de cromatina e cromossomos isolados no plano equatorial. Barra = 10 µm.

No presente estudo notou-se que as decocções da poaia possuem efeito genotóxico e efeito antiproliferativo. Tal resultado pode ser observado fazendo a comparação entre os tratamentos e o controle positivo, nos quais os tratamentos tiveram índices mitóticos e quantidade de células anormais parecidos com os mesmos. O potencial genotóxico de um extrato pode ser observado pela presença de aberrações cromossômicas durante o ciclo celular, sendo as mais comuns as células com cromossomos isolados, micronúcleos, pontes cromossômicas, células binucleadas, já o efeito antiproliferativo pode ser observado pela inibição da mitose, ou um elevado número de células em interfase (Souza et al., 2013; Barros et al., 2008).

## CONCLUSÃO

As decocções das raízes de *P. ipecacuanha* possuem efeito genotóxico, uma vez que todas as concentrações causaram alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepa* e *P. sativum*. Os extratos da poaia causam um efeito inibitório no ciclo celular dos dois bioindicadores testados, o que demonstra possuir efeito citotóxico e antiproliferativo. Sugere-se um maior cuidado na sua utilização pela população, deste modo indica-se o uso de decocções em concentrações pequenas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. G. S.; REIS, S. R.; ROBINSON, W. M. A.; BORGES-OSÓRIO, M. R. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência – Fac**, 20: 19- 26, 2005.
- BAGATINI, M. D; SILVA, A. C. F; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 17: 444-447, 2007.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. p.59-70.

- CAMPARATO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MONTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and molecular Biology**, 25:85-89, 2002.
- DIAS, M. G.; CANTO-DOROW, T. S.; COELHO, A. P. D.; TEDESCO, S. B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, 16: 202-208, 2014.
- EL-SHAHABY, A. O.; ABDEL, M. H. M.; SOLIMAN, M. I.; MASHALY I. A. Genotoxicity Screening of Industrial Wasterwater Using the *Allium Cepa* Chromosome Aberration Assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 6: 23-28, 2003.
- FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 17: 49-54, 2007.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, 11: 360-367, 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia(UFLA)**, 35:1039-1042, 2011.
- FRESCURA, V. D. S.; KUHN, A. W.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; NICOLOSO, F. T.; LOPES, S. J.; TEDESCO, S. B. Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (Rubiaceae) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (Brassicaceae). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 66:138–144, 2012.
- FISKESJÖ, G. *Allium* test: In vitro toxicity testing protocols, Meth. **Molecular Biology**, 43:119-127, 1995.
- GADANO, A.; GURNI A; LÓPEZ P; FERRARO G; CARBALLO M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. L. **Ethonopharmacol**, 81:11-16, 2002.

GALVÃO, M. **Índice de genotoxicidade por *Allium cepa* teste de bioindicador em águas poluídas por dejetos químicos no município de Alta Floresta–MT**. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato, 2008. 30p. (Trabalho de conclusão de curso).

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em Citogenética vegetal, animal e humana**. Funpec. São Paulo. 2003, 131p.

KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; TEDESCO, S. B. Chromatographic analysis and antiproliferative potential of aqueous extracts of *Punica granatum* fruit peels using the *Allium cepa* test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 51:212-238, 2015.

KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 949–954, 2010.

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

MA, T. H; XU, Z; XU, C; MCCONNELL, H; RABAGO, E. V; ARREOLA, G. A; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, 334(2):185-195, 1995.

MELLO, V. S.; MIRANDA, D. P.; SILVA, D. D.; MACHADO, D.; SILVA, A. B.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Efeito genotóxico de licor pirolenhoso de teca pelo bioindicador ervilha. **Estudos**, 41: 141-146, 2014.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. **Morte celular**. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A célula. São Paulo: Manole, 2001, p.278-280.

MOURA, R. T.; KARSBURG, I. V. **Citogenotoxicidade o licor pirolenhoso de *Tectona grandis* pelo *Allium cepa***. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2011, 11p. (Monografia Bacharelado em Engenharia Florestal).

MIGID, H. M.A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 6: 57-64, 2007.

NEVES, E. S. B.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, L. H. G. M.; PERON, A. P. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic

Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 86:1131-1136, 2014.

NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, 26: 331-334, 2003

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, 18: 537-544, 1996.

PESSOA, M. DO C. R. **Diversidade e riqueza da família Rubiaceae Juss. no Cariri Paraibano**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2009.83p. (Dissertação Mestrado em Biologia Vegetal).

PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucina sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 55-65, 2001.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, 28: 12-21, 2004.

SAMPAIO, J.; TREMÉA, R.; MARCO, M. G.; VIEIRA, R. B.; TACCA, J. A.; STRÖHER, D. J.; PILAR, B. C.; GÜLLICH, A. A. C. G.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, 10: 462-467, 2012.

SIDDIQUI, A. H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian Waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, 179: 241-253, 2011.

SILVA, E. P.; MOURA, J. W. M.; NETO, M. P. L. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica *Daturina ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas *Anna*. **Revista Saúde em foco**, 2: 25-48, 2015.

SILVA, J., ERDTMANN, B. e HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance.2003, 344 p.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil.

**Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 18: 140-156, 2013.

TEDESCO, S.B. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Sciences Intech**, 10: 108-116, 2012.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2003, p. 327-344.

VICENTINI, V.E.P. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 23:593-598, 2001.

VIEIRA, A.; GUIMARÃES, M. A.; DAVID, G. Q.; KARSBURG, I. V.; ANDRÉ, R. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, 3: 8- 18, 2009.

VIEIRA, D., VICENTINI, V.E.P. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, 42: 32-39, 1997.

#### 4.4 EFEITO GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE INFUSÕES DE FOLHAS DE *Psychotria ipecacuanha* (RUBIAEAE) SOBRE O CICLO CELULAR DE *Allium cepa* L E *Pisum sativum*

##### RESUMO

No Brasil há uma grande diversidade de espécies medicinais nativas que demonstram um enorme potencial econômico, as quais são utilizadas para tratar, curar e prevenir doenças. Porém, apesar das vantagens terapêuticas, alguns dos constituintes dessas plantas podem ser potencialmente tóxicos, e/ou genotóxicos. Diante disto, o objetivo do presente estudo foi analisar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato aquoso de folhas de *Psychotria ipecacuanha* em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Pisum Sativum*. Foram testadas cinco concentrações de decocção das folhas de poaia: 2g/L, 5g/L e 8g/L e cinco tempos de exposição das raízes as decocções: 24, 48, 72, 96 e 120h. Os bulbos de *Allium cepa* foram inicialmente colocados em água destilada e as sementes de *Pisum Sativum* foram colocadas em placas de Petri forradas com papel germitest e umedecido com água destilada, a fim de estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após os bulbos e sementes enraizarem, os mesmo foram colocados nas soluções teste pelo tempo determinado para cada tratamento. As raízes foram coletadas e lavadas em água destilada e posteriormente fixadas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento com o uso do corante orceina acética 2%. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células e multiplicando-se por 100. A partir da análise do ciclo celular de *Allium cepa* e *Pisum sativum*, observou-se que as decocções das folhas de *P. ipecacuanha* ocasionou um decréscimo do IM abaixo de 50%, o que demonstra que os extratos da poaia possuem um efeito letal ou subletal. As decocções apresentaram alto poder antiproliferativo, citotóxico e genotóxico, produzindo um efeito inibitório no ciclo celular e causando alterações cromossômicas nos dois bioindicadores testados, sendo as mais encontradas: cromossomos perdidos, micronúcleos e apoptose.

**Palavras-chave:** Poaia, índice mitótico, valor limite de citotoxicidade.

**GENOTÓXICO AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF LEAF INFUSIONS OF  
*Psychotria ipecacuanha* (RUBIAEAE) ON THE CELL CYCLE OF *Allium cepa* L E  
*Pisum sativum***

**ABSTRACT**

In Brazil, there is a great diversity of native medicinal species, which demonstrate an enormous economic potential, which are used to treat, cure and prevent diseases. However, despite the therapeutic advantages, some of the constituents of these plants may be potentially toxic, and / or genotoxic. In view of this, the objective of the present study was to analyze the possible cytotoxic and genotoxic effects of the aqueous extract of *Psychotria ipecacuanha* leaves in meristematic cells of *Allium cepa* and *Pisum Sativum*. Five decoction concentrations of leaves were evaluated: 2g / L, 5g / L and 8g / L and five roots exposition times the decoctions: 24, 48, 72, 96 and 120h. *Allium cepa* bulbs were initially placed in distilled water and the *Pisum Sativum* seeds were placed in Petri dishes lined with germitest paper and moistened with distilled water in order to stimulate the development of the meristem root. After the bulbs and seeds were rooted, they were placed in the test solutions by the time determined for each treatment. The roots were collected and washed in distilled water, then fixed. The blades were prepared by the crushing technique using the acetic orcein 2% dye. The mitotic index was obtained by dividing the number of cells in mitosis by the total number of cells and multiplying by 100. From the cell cycle analysis of *Allium cepa* and *Pisum sativum*, it was observed that the decoctions of the leaves of *P. Ipecacuanha* caused a decrease of the IM below 50%, which shows that the extracts of the poaia have a lethal or sublethal effect. The decoctions presented high antiproliferative, cytotoxic and genotoxic power, producing an inhibitory effect on the cell cycle and causing chromosomal alterations in the two bioindicators tested, being the most found: lost chromosomes, micronuclei and apoptosis.

**Key words:** Poaia, mitotic index, limit value of cytotoxicity.

## INTRODUÇÃO

No Brasil há uma grande diversidade de espécies medicinais nativas que demonstram um enorme potencial econômico, as quais são utilizadas para tratar, curar e prevenir doenças, sendo uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. A utilização destas espécies teve origem na prática indígena, que em conjunto a outras práticas trazidas por escravos africanos e colonizadores portugueses resultaram em uma rica cultura popular (Ping et al., 2012; Pinho et al., 2010). Porém, apesar das vantagens terapêuticas, alguns dos constituintes dessas plantas podem ser potencialmente tóxicos, genotóxicos e citotóxicos.

O conhecimento dos componentes físicos, químicos e biológicos que causam alterações gênicas e genômicas é necessário para melhor preservar a saúde humana ao longo do tempo. Além disso, o modo de preparo das infusões e chás (com material seco ou verde) e a dose utilizada podem influenciar nos efeitos destes materiais, podendo aumentar a toxicidade e conseqüentemente acarretar em mutações e alterações celulares (Poletto et al., 2011; Duarte et al., 2015). Devido à grande utilização das plantas medicinais, o conhecimento das mesmas, desde os níveis celulares, bem como a ação sobre os organismos vivos, torna-se imprescindível (Frescura, 2012).

Substâncias genotóxicas são todas aquelas que têm afinidade para interagir com o DNA, são conhecidas por causar lesões nos materiais genéticos, ou danos a organismos vivos que estão frequentemente expostos a ela. Tais danos acabam afetando processos como a transcrição, duplicação gênica e levam a alterações cromossômicas, ocasionando processos cancerosos e morte celular, podem ser induzidos por agentes químicos, biológicos e físicos (Costa e Menk, 2000; Dias et al., 2014).

Os efeitos da genotoxicidade e/ou mutagenicidade podem ser constatados pelo fenômeno da inibição e/ou por alterações na divisão celular, os quais podem ser causados pela ação dos componentes existentes nas plantas medicinais (Frescura, 2012). Para uma completa avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade, os extratos provenientes de plantas devem ser estudados em diversos sistemas-testes, e em diferentes concentrações e tempos de exposição (Przedpelska--Wasowicz e Wierzbika 2010; Silva et al., 2015).

O uso do bioteste *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas, como eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (Cabrera e Rodriguez 1999; Silva et al. 2004). Os dados obtidos por meio deste sistema teste são excelentes parâmetros de análise citotóxica, mutagênciã e antimutagênica sendo indicado para preverniã a populaçãõ sobre o consumo de medicamentos sintéticos e naturais (Fachinetto et al.2007).

O teste de *Allium cepa* é amplamente utilizado como bioindicador, devido a determinadas características, como: crescimento rápido de suas raízes, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, grande número de células em divisãõ, fácil manuseio, baixo custo, além de possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho (Silva et al., 2015). Deste modo, o objetivo deste estudo foi analisar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato aquoso de folhas de *Psychotria ipecacuanha* (poaia) em células meristemáticas por meio do teste *Allium cepa* e *Pisum Sativum*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Alta Floresta – MT.

### **Área de estudo e material de coleta**

Para os testes de genotoxicidade e citotoxicidade utilizou-se folhas secas de *Psychotria ipecacuanha*, provenientes de uma população natural situada no município de Denise (S 14°39' e W 57°05'), Mato Grosso.

### **Montagem do experimento**

Foram utilizados bulbos de *Allium cepa* e sementes *Pisum sativum* adquiridos no comércio local, e folhas secas de *Psychotria ipecacuanha* para obtenção de decocção que formaram os tratamentos. Os tratamentos foram

constituídos de 3 concentrações: 2g/L, 5g/L e 8g/L, e cinco horários de exposição das raízes a decocção: 24h, 48h, 72h, 96h e 120h.

Para obtenção das decocções as folhas foram trituradas, e pesadas de acordo com a concentração de cada tratamento, posteriormente foram levadas ao fogo em 1 litro de água da torneira, deixando ferver por 10 minutos, após procedeu-se a coagem da decocção e deixou-se em repouso até esfriar, como recomendado por populares que fazem o uso da planta medicinal.

Para os testes foram utilizados cinco bulbos cebola e 10 sementes de ervilha para cada tratamento e para os controles. O controle negativo constituiu de bulbos e sementes germinados e tratados em água destilada, enquanto que o controle positivo constitui de bulbos e sementes germinados em água e tratados em solução de paracetamol a 0,2%.

Os bulbos foram colocados em copos plásticos descartáveis (10 mL) para o enraizamento das cebolas. A água foi trocada a cada 24 horas. Para a germinação, as ervilhas foram colocadas em placa de petri forrada com papel Germitest e acondicionadas em câmara de germinação (BOD) com ambiente controlado a uma temperatura de 25° C.

Após a germinação e as raízes atingirem 1cm de comprimento, os bioindicadores receberam as decocções e as coletas foram realizadas de acordo com os tempos determinados para cada tratamento. As raízes coletadas foram lavadas em água destilada e posteriormente fixadas em solução de metanol: ácido acético na proporção de 3:1 e acondicionados em refrigerador até o momento de preparo das lâminas.

### **Preparo das lâminas**

No momento do preparo das lâminas, as raízes foram lavadas em água destilada por 15 minutos, realizando-se 3 lavagens, tais lavagens tem por finalidade realizar a retirada do fixador do citoplasma da célula, a fim de que o corante consiga reagir perfeitamente com as células.

Para a hidrolise das células foi utilizado HCl 5N, as raízes das cebolas ficaram expostas ao ácido por 11 minutos, enquanto que as da ervilha necessitaram de 15 minutos. Ao término desse processo, foram lavadas novamente conforme o

procedimento anterior. O procedimento teve o objetivo de dissolver as organelas das células meristemáticas, deixando somente a parede celular e o material genético.

Para os preparo das lâminas procedeu-se o método de esmagamento com o uso do coranteorceina acética 2%, utilizou se uma radícula por lâmina, ou seja, foram analisadas duas radículas por bulbo. As radículas foram dispostas sobre a lâmina de microscopia, sendo a região meristemática (identificada pela coloração esbranquiçada) seccionada com o auxílio de um bisturi. Ao material, em plena atividade celular, foi acrescentada uma gota do corante, sendo realizado esmagamento do material com o bastão de vidro. Após o material foi coberto com a lamínula e o excesso do corante foi retirado com papel filtro (Guerra et al., 2003; Galvão, 2008).

As lâminas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico (LEICA) com a objetiva de 40X observando-se células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase e a possível ocorrência de alterações cromossômicas durante o ciclo celular. Foram analisadas 10 lâminas por tratamento, 500 células por lâmina, perfazendo um total de 5000 células por tratamento.

O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100 (Oliveira et al., 1996; Pires et al., 2001). As imagens de interesse (anomalias) foram fotografadas com o uso de objetiva de 100X em um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e software LAZ EZ V1. 7.0.

Para o cálculo o Valor Limite de Citotoxicidade foi realizado a divisão do índice mitótico da amostra pelo índice mitótico do controle negativo e multiplicando-se por 100 (Migid et al., 2007).

Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variância, sendo realizada transformação dos dados quando necessário. Uma vez que foram atendidas às pressuposições estatísticas, foi realizada à análise de variância e para as causas de variações significativas, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa Estatístico Sisvar® (Ferreira, 2011). Para a comparação entre as concentrações foi realizado o teste de regressão a 5% de probabilidade com o auxílio do software Sigmaplot® 11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Bioteste com *Allium cepa***

De acordo com os resultados obtidos no experimento de análise da genotoxicidade e citotoxicidade, a maior parte das células se encontrava em interfase (Figura 1), e todos os tratamentos com extratos de poaia não diferiram do controle negativo, sendo a maior quantidade encontrada para o tratamento com menor concentração e tempo de exposição (2g/ 24h). A grande quantidade de células em interfase encontrada indica a ocorrência de inibição do ciclo celular, o que leva a uma diminuição do índice mitótico, o que demonstra que os extratos analisados ocasionam um efeito antiproliferativo sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Em estudos com *Pterocaulon polystachyum*, Knoll et al. (2006), também observaram um grande número de células em interfase e uma inibição da divisão celular, tendo este efeito acentuado conforme o aumento da concentração dos extratos aquosos (chás).

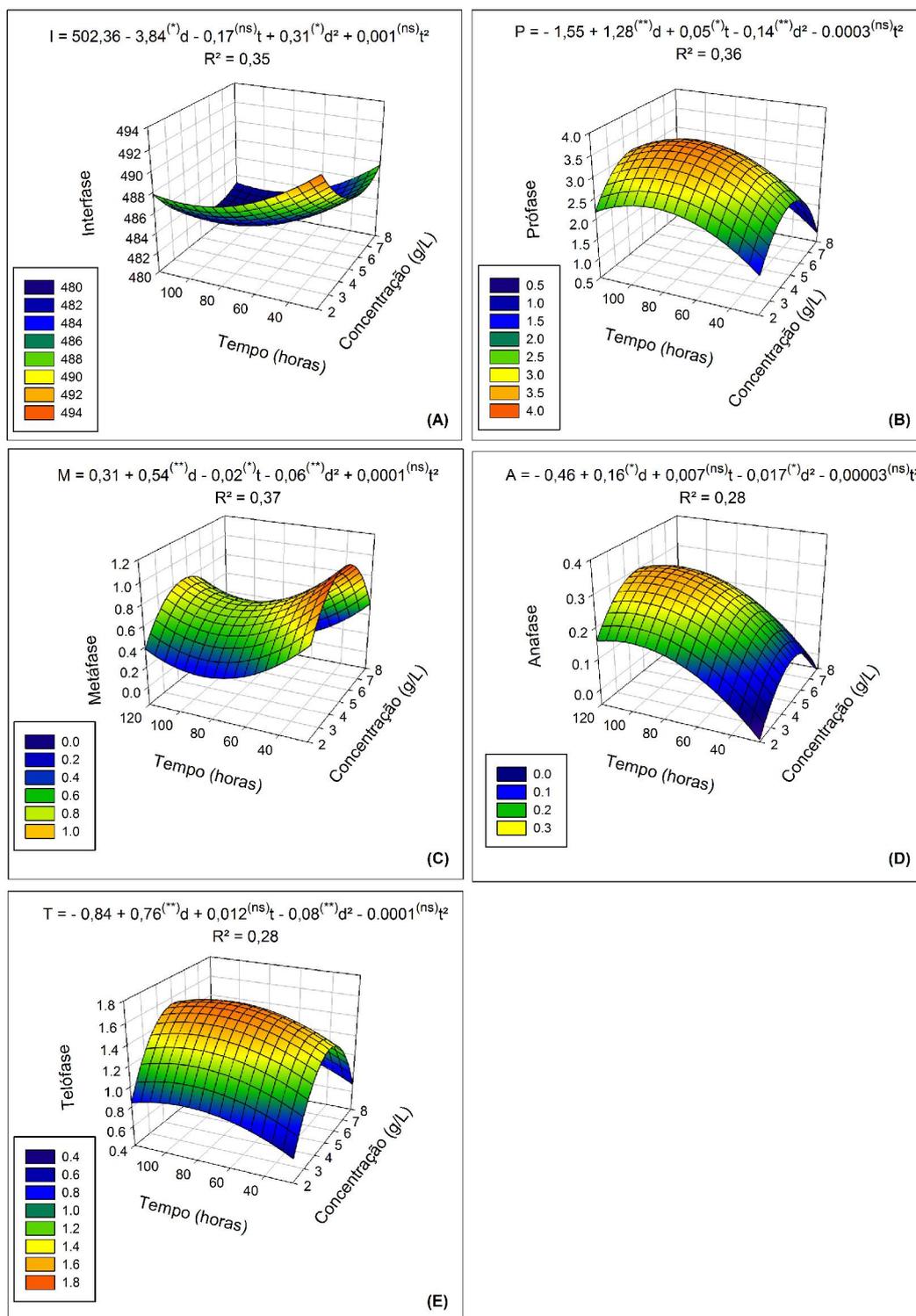


Figura 2. Divisões normais do Ciclo celular de *Allium cepa* tratada com decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*. Em (A) células em interfase, (B) em prófase, (C) em metáfase, (D) em anáfase e (E) em telófase.

Na avaliação da mitose normal (Figura 1, Tabela 1), foi encontrado um número reduzido de células em plena divisão celular. Nas fases de prófase e telófase os tratamentos tiveram efeitos semelhantes, sendo que os tempos e concentrações intermediários foram os que apresentaram maior quantidade de células. Na metáfase a concentração de 5g/L nos tempos de 24 e 48 horas de exposição apresentou a maior quantidade de células. Já na anáfase os maiores valores foram encontrados para a concentração de 5g/L, nos tempos de 96 e 120 horas.

Tabela 1. Ciclo celular de *Allium cepa* com divisões anormais obtidas do tratamento em diferentes doses e horários de exposição á decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*. (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ ).

Dose	Tempo	Divisões Anormais			
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
<b>C. Negativo</b>	24h	0.00 b	0.00 d	0.00 b	0.00 d
<b>C. Positivo</b>	24h	17,70 a	2,60 abcd	1,60 ab	0.80 bcd
<b>2g/L</b>	24h	1,50 b	2,30 abcd	2,60 ab	0.90 abcd
	48h	1,90 b	2,40 abc	2,20 ab	1.00 abcd
	72h	1,60 b	1,30 abcd	1,50 ab	0.30 cd
	96h	0,80 b	0,60 cd	0,90 ab	0.00 d
	120h	0,60 b	1,10 bcd	0,60 ab	0.50 bcd
<b>5g/L</b>	24h	0,30 b	1,40 abcd	1,30 ab	0.00 d
	48h	0,70 b	1,00 bcd	1,50 ab	0.30 cd
	72h	2,10 b	1,60 abcd	1,80 ab	1.30 abcd
	96h	3,30 ab	2,70 abc	2,70 a	2.10 ab
	120h	3,80 ab	2,80 abc	2,60 ab	1.50 abcd
<b>8g/L</b>	24h	1,40 b	3,60 ab	1,60 ab	0.30 cd
	48h	2,90 ab	3,60 ab	2,30 ab	1.30 abcd
	72h	3,00 ab	3,90 ab	2,40 a	2.00 abc
	96h	4,10 ab	2,40 abc	1,50 ab	0.90 abcd
	120h	4,60 ab	4,10 a	1,40 ab	2.70 a
<b>CV (%)</b>		51.54	29.41	32.89	26.72

Medias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade

Na análise das fases da divisão celular a concentração intermediária (5g/L) foi a que apresentou menor efeito inibitório do ciclo celular (Figura 1). Vários autores relatam os efeitos das infusões de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, demonstrando que os principais efeitos que podem ocorrer são: o aumento ou redução da mitose, bem como a mutagenicidade e anti-mutagenicidade (Vicentini et al., 2001; Teixeira et al., 2003; Knoll et al., 2006).

Os maiores valores de células em interfase anormal foram encontradas no tratamento de 8 g/L nos tempos de 72 e 96 h de exposição (Figura 2). Nos tratamentos com decocções de poaia observou-se que além de apresentarem um alto número de células em interfase, também ocasionou o aparecimento de grande quantidade de interfases anormais, demonstrando que mesmo em concentrações menores tais extratos causam dano ao DNA levando ao surgimento de células com alterações celulares.

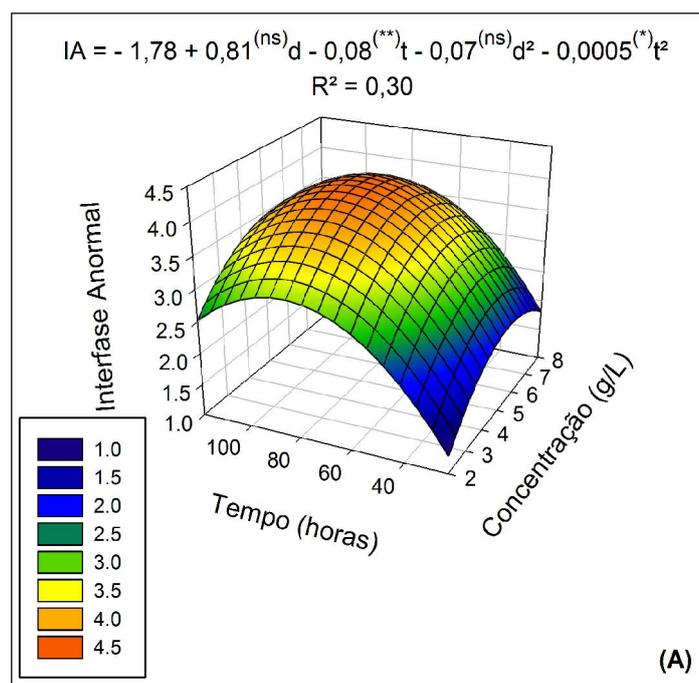


Figura 2. Células em interfases anormais do Ciclo celular de *Allium cepa* tratada com decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*.

Nas divisões celulares anormais (Tabela 2) os maiores valores foram encontrados para o controle positivo, sendo os tratamentos decocções das folhas de poaia estatisticamente diferente do controle positivo na interfase, e iguais nas demais fases da divisão celular. Apesar das fases de prófase, metáfase, anáfase e

telófase serem iguais ao controle positivo, a maior parte dos tratamentos também não diferiram do controle negativo. Observa-se que os tratamentos diferiram do controle positivo, tendo valores intermediários entre os dois controles. Os tratamentos: 5g<sup>-1</sup>/96h, 5g<sup>-1</sup>/120h, 8g<sup>-1</sup>/48h, 8g<sup>-1</sup>/72h, 8g<sup>-1</sup>/96h, 5g<sup>-1</sup>/120h apesar de diferirem do controle positivo, e apresentarem valores intermediários aos dois controles, apresentaram maior quantidade de células com irregularidades quando comparado ao controle negativo, indicando haver um potencial genotóxico nestes tratamentos.

Tabela 2. Porcentagem de células normais e anormais, índice mitótico (IM) e Valor Limite de Citotoxicidade (VLC), do ciclo celular de *Allium cepa* exposta a diferentes doses e horários de exposição de decoção de folhas de *Psychotria ipecacuanha* (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ ).

Dose	Tempo	Total de Células	C. Normais (%)	C. Anormais (%)	I.M.	VLC (%)
C. Negativo	24h	5000	100,00 a	0,00 d	6,24 a	100,00
C. Positivo	24h	5000	40,86 b	59,14 a	0,66 bcd	10,57
2g/L	24h	5000	98,24 a	1,760 bcd	1,08 bcd	17,30
	48h	5000	88,14 a	2,02 bcd	0,64 bcd	10,25
	72h	5000	98,42 a	1,58 bcd	0,52 bcd	8,33
	96h	5000	98,90 a	1,10 bcd	0,40 bcd	6,41
	120h	5000	99,08 a	0,92 bcd	0,60 bcd	9,61
5g/L	24h	5000	99,30 a	0,70 cd	0,64 bcd	10,25
	48h	5000	98,76 a	1,24 bcd	1,06 bcd	16,98
	72h	5000	98,06 a	1,94 bcd	1,44 bc	23,07
	96h	5000	96,60 a	3,40 b	1,50 b	24,03
	120h	5000	96,94 a	3,06 bc	1,00 bcd	16,02
8g/L	24h	5000	97,98 a	2,02 bcd	0,24 d	3,84
	48h	5000	97,20 a	2,80 bc	0,32 cd	5,12
	72h	5000	97,04 a	2,96 bc	0,50 bcd	8,01
	96h	5000	97,82 a	2,18 bc	0,80 bcd	12,82
	120h	5000	96,96 a	3,04 bc	0,72 bcd	11,21
CV (%)			8.33	23.75	18.67	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Dados sobre o potencial genotóxico de extratos vegetais, podem ser obtidos a partir de estudos das alterações cromossômicas no ciclo de celular, tal potencial é caracterizado pela capacidade de um agente promover alterações no DNA de uma célula, sendo que estas alterações são ou não passíveis de correção pelo sistema de reparo celular, um dos sinais de aberrações cromossômicas é o aparecimento de micronúcleos. Fusconi et al. (2007) e Marcano et al. (2004) afirmam, ainda, que a interferência na normalidade dos fusos mitóticos pode levar à formação de MN e a inibição do ciclo celular, o que indicam uma evidência da genotoxicidade de extratos vegetais.

No presente estudo o índice mitótico variou de 0,24 para o tratamento 8g-1/24h a 6,24 para o controle negativo (Tabela 2, Figura 3), todos os tratamentos não diferiram do controle negativo, indicando que os extratos causaram uma inibição no ciclo celular de *A. cepa*. O índice mitótico permite avaliar a citotoxicidade de agentes mutagênicos, e é amplamente utilizado no estudo de toxicidade de extratos de plantas medicinais, sendo que o declínio do IM indica uma ação citotóxica do extrato sobre o sistema teste (Silva et al., 2015; Fiskejo e Levan, 1994).

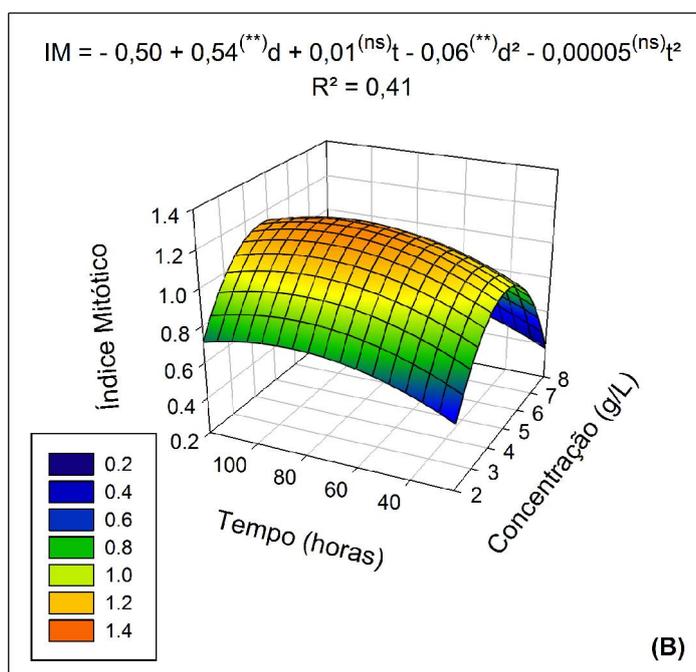


Figura 3. Índice mitótico do Ciclo celular de *Allium cepa* tratada com decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*.

Louvatel et al. (2014) em estudos com *Stachys byzantina* C. Koch e *Tropaeolum majus* L., constataram que os extratos destas espécies possuem atividade antiproliferativa e citotóxica, indicando seu potencial terapêutico para a inibição do ciclo celular. Outros trabalhos com plantas medicinais também indicam o efeito antiproliferativo de plantas medicinais, como os realizados em: *Caesalpinia pyramidalis*, *Caesalpinia férrea*, *Mikania cordifolia*, *Daturnera ulmifolia* e *Pluchea sagittalis* (Rossato et al., 2010; Silva et al., 2015; Dias et al., 2014).

### **Bioteste *Pisum sativum***

Os resultados de células normais e anormais em interfase e nas quatro fases da divisão celular obtida a partir da exposição das raízes de *Pisum sativum* em decocção de folhas de poaia estão demonstrados na Tabela 3 e Figura 4. Observa-se que na interfase normal os maiores valores foram encontrados para o tempo de 72h e na concentração de 2g/L (Figura 4A). Em estudos com *Pterocaulon polystachyum* DC Knoll et al. (2006) também observaram aumento no número de interfase de células meristemáticas de *A. cepa*, ocorrendo inibição da divisão celular, evidenciando o efeito antiproliferativo do extrato da espécie. Tal efeito também foi observado por Fachinetto e Tedesco (2009) em estudos com extratos aquosos de *Baccharis trimera* e *B. articulata* que também apresentaram inibição da divisão celular e causaram alterações celulares, indicando a ocorrência de atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos, resultados semelhantes foram observados no presente estudo.

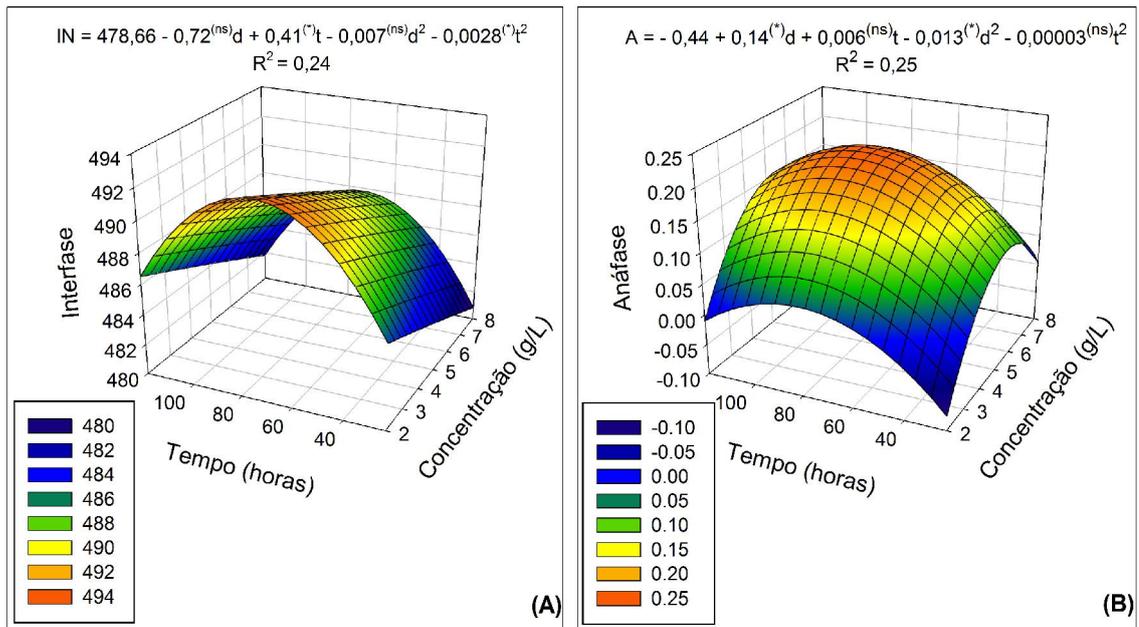


Figura 4. Número de células do ciclo celular em interfase (A) e anáfase (B), de *Pisum sativum* tratada com decoção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*.

O número de células que se encontravam nas quatro fases da mitose, foram relativamente baixo, sendo o maior valor encontrado de 2,50 células no tratamento 5g.L<sup>-1</sup>/96h, não diferindo do controle negativo, demonstrando haver uma inibição do ciclo celular (Tabela 3). Os efeitos da genotoxicidade e/ou citotoxicidade podem ser constatados pelo fenômeno da inibição da divisão celular, o qual pode ser causado pela ação dos componentes existentes nas plantas medicinais (Frescura, 2012).

Tabela 3. Ciclo celular de *P. sativum*. L. com divisões normais e anormais obtidas do tratamento em diferentes doses e horários de exposição á decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha* (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ ).

Dose	Tempo	Divisões Normais			Divisões Anormais		
		Prófase	Metáfase	Telófase	Prófase	Anáfase	Telófase
C. Negativo	24h	23,10 a	3,90 a	2,90 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b
C. Positivo	24h	2,90 b	0,00 b	0,00 b	17,70 a	1,60 ab	0,80 ab
2g/L	24h	1,60 b	0,30 b	0,30 b	7,70 ab	0,80 ab	2,90 a
	48h	1,40 b	0,20 b	0,10 b	3,80 a	2,50 a	0,90 ab
	72h	0,90 b	0,00 b	0,00 b	0,30 c	0,00 b	0,00 b
	96h	0,50 b	0,10 b	0,00 b	0,40 c	0,10 b	0,10 b
	120h	2,30 b	0,30 b	0,10 b	2,10 abc	0,60 ab	0,70 ab
5g/L	24h	2,00 b	0,50 b	0,10 b	3,10 abc	1,20 ab	1,50 ab
	48h	2,30 b	0,30 b	0,20 b	3,10 abc	0,90 ab	1,60 ab
	72h	1,80 b	0,60 b	0,30 b	4,90 abc	1,60 ab	2,80 a
	96h	2,50 b	0,50 b	0,30 b	3,10 abc	2,10 ab	1,70 ab
	120h	0,70 b	0,00 b	0,00 b	1,40 bc	0,80 ab	0,90 ab
8g/L	24h	1,40 b	0,40 b	0,30 b	2,00 abc	0,70 ab	1,70 ab
	48h	2,40 b	0,80 b	0,80 b	2,30 abc	1,50 ab	1,40 ab
	72h	1,70 b	0,10 b	0,30 b	2,10 abc	1,50 ab	0,70 ab
	96h	0,40 b	0,20 b	0,10 b	0,80 bc	0,50 ab	1,30 ab
	120h	0,80 b	0,60 b	0,20 b	1,80 abc	1,00 ab	0,80 ab
CV (%)		32.85	23.95	19.56	56.25	34.45	34.35

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Na observação do ciclo com células anormais, quanto ao número de células em interfase, apenas o tratamento 8g.L<sup>-1</sup>/120h diferiu do controle negativo, obtendo o maior número de células (Tabela 3, Figura 5 A). Em metáfase anormal o tratamento com tempo de exposição de 24 horas e na concentração de 5g/L e 8g/L (Figura 5B), apresentaram um maior índice de células com irregularidades, demonstrando que o aumento da concentração ocasionou um aumento no número de células com irregularidades. Já para as demais fases a maior parte dos tratamentos não diferiu entre si e dos dois controles. A ação fisiológica dos extratos de poaia ocasionou uma diminuição na quantidade de células em plena divisão celular, e das que se encontrava em uma das fases da mitose, a maioria possuía

alterações cromossômicas, deste modo quando os extratos não possuíram alto poder antiproliferativo, demonstraram uma alta genotoxicidade.

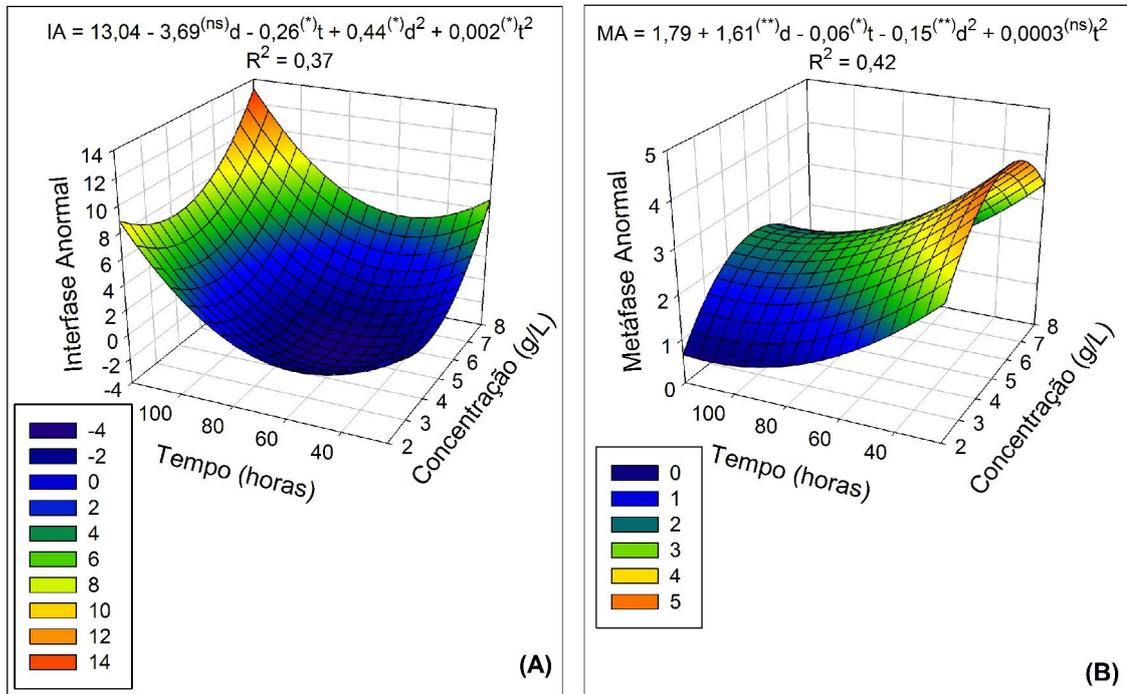


Figura 5. Número de células do ciclo celular em interfase anormal (A) e metáfase anormal (B), de *Pisum sativum* tratada com decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*.

A porcentagem de células anormais variou nos tratamentos com decocção, de 0,26 em 2g.L<sup>-1</sup>/96h a 7,02 para 8g.L<sup>-1</sup>/120h (Tabela 4), sendo este o único que diferiu do controle negativo. A maior concentração e tempo de exposição a decocção de folhas da poaia se mostrou genotóxica, causando alterações no ciclo celular e ocasionando o aparecimento de anomalias, como micronúcleo e cromossomos isolados.

Tabela 4. Porcentagem de células normais e anormais, índice mitótico (IM) e Valor Limite de Citotoxicidade (VLC), do ciclo celular de *Pisum sativum*. L. exposta a diferentes doses e horários de exposição de decocção de folhas de *Psychotria ipecacuanha* (Dados transformados para  $(x+1)^{0,5}$ ).

Dose	Tempo	Total de Células	C. Normais (%)	C. Anormais (%)	I.M.	VLC (%)
<b>C. Negativo</b>	24h	5000	100,00 a	0,00 d	6.46 a	100,00
<b>C. Positivo</b>	24h	5000	68,74 b	31,26 a	0.66 b	10,21
<b>2g/L</b>	24h	5000	96,00 a	4,00 bc	0.44 b	6,81
	48h	5000	97,66 a	2,34 bcd	0.34 b	5,26
	72h	5000	98,74 a	1,26 cd	0.18 b	2,78
	96h	5000	99,74 a	0,26 d	0.12 b	1,85
	120h	5000	98,76 a	1,24 cd	0.54 b	8,35
<b>5g/L</b>	24h	5000	97,44 a	2,56 bcd	0.52 b	8,04
	48h	5000	97,94 a	2,06 bcd	0.56 b	8,66
	72h	5000	97,34 a	2,66 bcd	0.60 b	9,28
	96h	5000	97,96 a	2,04 bcd	0.76 b	11,76
	120h	5000	98,88 a	1,12 cd	0.14 b	2,16
<b>8g/L</b>	24h	5000	98,48 a	1,52 cd	0.44 b	6,81
	48h	5000	98,24 a	1,76 cd	0.82 b	12,38
	72h	5000	98,30 a	1,70 cd	0.42 b	6,50
	96h	5000	98,74 a	1,26 cd	0.16 b	2,47
	120h	5000	92,98 a	7,02 b	0.34 b	5,26
<b>CV (%)</b>			3.57	31.40	17.80	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de TuKey a 5% de probabilidade.

Mello et al., (2014) em estudos sobre a ação do extrato de teca (*Tectona grandis*) sobre o ciclo celular de *Pisum sativum*, observaram um potencial genotóxico ao decorrer do tempo de exposição, o extrato causou maior inibição do ciclo celular. Além de demonstrar que *Pisum sativum* é uma boa alternativa para monitorar a ação de substâncias tóxicas, devido sua sensibilidade aos efeitos alelopáticos do extrato analisado. Tal bioindicador já havia sido usado por Ivanova et al. (2002), na análise

de águas contaminadas por metais pesados, sendo encontrando um efeito citotóxico sobre as células meristemáticas de *Pisum sativum*.

A ação das decoções sobre o ciclo celular de *Pisum sativum* ocasionaram uma diminuição do IM, o qual variou de 0,12 para 2g.L<sup>-1</sup>/96h a 6,46 para o controle negativo (Tabela 4, Figura 6). Em trabalho com espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), Comparato et al. (2002) também observaram que concentrações mais elevadas promoveram uma redução no índice mitótico.

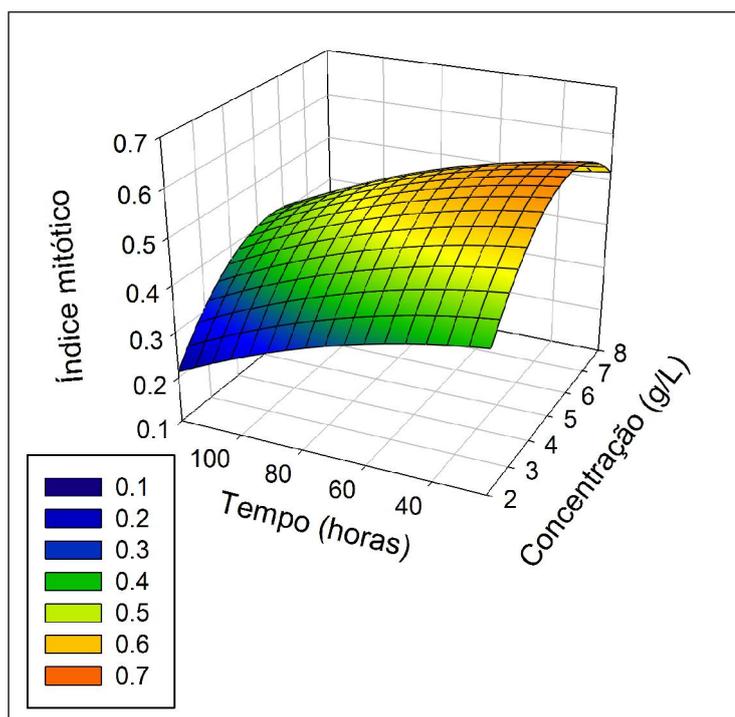


Figura 6. Índice mitótico do Ciclo celular de *Pisum sativum* tratada com decoção de folhas de *Psychotria ipecacuanha*.

Dornelles (2015) observou uma capacidade antiproliferativa acentuada nos extratos e frações de *Richardia brasiliensis*, tal resultado também foi observado por Frescura, 2012 em *Psychotria brachypoda*, sendo verificado que em ambos os estudos ocorreu a dose dependência, onde quanto maior a dose ou tempo de exposição, mais acentuada foram as inibições do ciclo celular, o que acarretou em decréscimo do índice mitótico. Este efeito também foi descrito por Ping et al. (2012) em estudos de diferentes concentrações de extrato metanólico de *Euphorbia hirta*.

Segundo Rodrigues et al. (1992), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de

membranas e na ativação de enzimas, esta ação antiproliferativa e consequentes alterações cromossômicas podem ser visualizadas durante o ciclo celular de bioindicadores, evidenciando a mutagenicidade e/ou citotoxicidade de determinada substância.

O nível de citotoxicidade de um extrato vegetal pode ser determinado pela diminuição do índice mitótico e valor limite de citotoxicidade. Para *Pisum sativum* todas as concentrações e tempos de exposição as decocções apresentaram valores abaixo de 22%, demonstrando possuir efeito letal. Para *Allium cepa* todos tratamentos 5g.L<sup>-1</sup>/72h e 5g.L<sup>-1</sup>/96h apresentaram efeitos subletais, enquanto os demais tratamentos apresentaram efeito letal (Tabela 4, Figura 7). Uma redução do VLC inferior a 22% do valor do controle negativo causa efeitos letais, enquanto reduções abaixo de 50% usualmente tem efeitos sub-letais (Migid et al., 2007;Oliveira 2013).Conceição (2010) em estudos sobre efeito antiproliferativo do chimarrão e do tereré (*Ilex paráguariensis*) sobre o ciclo celular de *A. cepa*, observaram que os tratamentos com infusões (chimarrão) tiveram VLC menores que 50%, apresentando efeitos sub-letais, enquanto que nos tratamentos com água fria (tereré) não houve diminuição do índice mitótico.

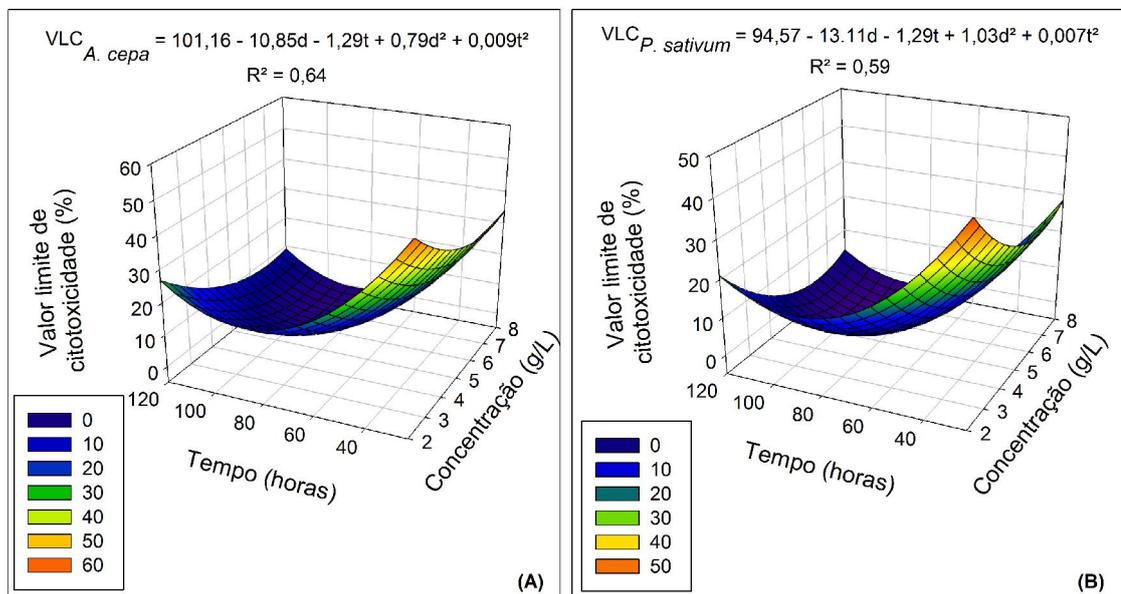


Figura 7. Valor limite de citotoxicidade (%) em células meristemáticas de *Allium cepa*(A) e *Pisum sativum*(B).

A análise de alterações cromossômicas serve como teste de genotoxicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos potenciais, os quais podem ser detectados, citologicamente pela interrupção em metáfases, trocas entre cromátides irmãs, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de inibição do ciclo celular (Bagatini et al., 2007; Teixeira et al., 2003). A partir das células observadas, foram encontrados para ambos os bioindicadores diferentes tipos de alterações cromossômicas e as mais comuns analisadas foram: de cromossomos perdidos, micronúcleo, apoptose, cromossomos retardatários, pontes cromossômicas, etc.

Os micronúcleos são originados de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebras isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, podendo, em cada célula, aparecer mais de uma vez (Balieiro et al., 2010). Deste modo observa-se que a grande quantidade de cromossomos perdidos encontrados no presente estudo pode estar originando uma grande quantidade de micronúcleos observados.

Em estudos com extrato pirolenhoso de *Tectona grandis*, Moura et al (2011) também observaram células com cromossomos isolados e células com micronúcleos, decorrente de alteração estrutural nas células somáticas de *Allium cepa*, demonstrando que as substâncias induziram as mutações cromossômicas.

Para a concentração de 8g/L no bioindicador *Pisum sativum* observou-se 296 células em apoptose, apontando que os extratos de *P. ipecacuanha* possuem um alto efeito antiproliferativo em concentrações maiores, para as outras doses e bioindicador foram observados células em apoptose porém em quantidade menor. Alguns compostos têm atividade alelopática inibitória em altas concentrações, no entanto em baixas concentrações podem não estimular o mesmo processo (Rice, 1984). Vieira et al. (2009) em estudos com capítulos florais de camomila (*M. recutita*) verificou um aumento significativo no número de células em morte celular, concomitante ao aumento das doses.

## CONCLUSÃO

As decocções das folhas de *P. ipecacuanha* possuem efeito genotóxico, uma vez que todas as concentrações causaram alterações cromossômicas no ciclo

celular de *Allium cepa* e *P. sativum*. Além de apresentar alto poder antiproliferativo e citotóxico, o que afeta o desenvolvimento normal do ciclo celular dos dois bioindicadores testados.

Sugere-se um maior cuidado na sua utilização pela população, principalmente pelo fato de ocorrer um aumento no número de aberrações celulares conforme o aumento na concentração, deste modo indica-se o uso de decocções em concentrações menores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALIEIRO, F. P; BARBOSA, S; FREITAS, N. C; RIBEIRO, L. O; BEIJO, L. A; SANTOS, B. R. Influência de extratos foliares de barbatimão sobre a germinação e ciclo celular de *Allium cepa*. XIX congresso de pós-graduação da UFLA, 2010.
- CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays. **Mutation Research**, 426: 211-214, 1999.
- CAMPARATO, M. L; TEIXEIRA, R. O; MONTOVANI, M. S; VICENTINI, V. E. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and molecular Biology**, 25:85-89, 2002.
- CONCEIÇÃO, T.S. **Efeito antiproliferativo, mutagênico e antineoplásico de produtos comerciais da erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010, 72p. (Dissertação - Programa de PósGraduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste).
- COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, 3: 24-26, 2000.
- DIAS, M. G.; CANTO-DOROW, T. S.; COELHO, A. P. D.; TEDESCO, S. B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16:202-208, 2014.
- DORNELLES, R.C. **Potencial antiproliferativo, genotóxico e fitoquímica de *Richardia brasiliensis* Gomes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2015, 113. (Dissertação- Pós –Graduação em Agrobiologia).

- DUARTE, I. D.; MALINI, M.; GRACELI, J.B.; MATSUMOTO, S.T. Investigação genotóxica do extrato aquoso de *Rhizophora magle* L. em ratas Wistar. **Natureza on line**, 13: 77-81, 2015.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11: 360-367, 2009.
- FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17: 49-54, 2007.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia(UFLA)**, 35:1039-1042, 2011.
- FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten melC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, 2: 139-149, 1994.
- FRESCURA, V. D. S. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith e Downs (Rubiaceae)**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 74f. (Dissertação - Mestrado em Agrobiologia).
- FRESCURA, V.D.; LAUGHINGHOUSE, I. V.; TEDESCO, S.B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. **Caryologia**, 65: 27-33, 2012.
- FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. **Mutation Research**, 632: 9–19, 2007.
- GALVÃO, M. **Índice de genotoxicidade por *Allium cepa* no teste de bioindicador em águas poluídas por dejetos químicos no município de Alta Floresta–MT**. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato, 2008. 30p. (Trabalho de conclusão de curso).
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em Citogenética vegetal, animal e humana**. Funpec. São Paulo. 2003, 131p.

IVANOVA, E.; STAIKOVA, T.; VELCHEVA, I. Mutagenic effect of water polluted with heavy metals and cyanides on *Pisum sativum* plant in vivo. **Journal of BalkanEcology**, 3: 307-310, 2002.

KNOLL, M.F.; SILVA, A.C.F.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 539–542, 2006.

LOUVATEL, K. M.; ZAIONS, M. I. M.; ARENHART, A. R. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos de *Stachys byzantina* c. Koch. (pulmonária) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha), utilizando o sistema teste *Allium cepa*. **Unoesc e Ciência – ACBS**, 12: 29-34, 2014.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; CAMPO, A. D. Montiel, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, 94: 221-226, 2004.

MELLO, V. S.; MIRANDA, D. P.; SILVA, D. D.; MACHADO, D.; SILVA, A. B.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Efeito genotóxico de licor pirolenhoso de teca pelo bioindicador ervilha. **Estudos**, 41: 141-146, 2014.

MIGID, H. M.A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 6: 57-64, 2007.

MOURA, R. T.; KARSBURG, I. V. **Citogenotoxicidade o licor pirolenhoso de *Tectona grandis* pelo *Allium cepa***. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2011, 11p. (Monografia Bacharelado em Engenharia Florestal).

OLIVEIRA, G. L. S. **Avaliação da toxicidade de efluente kraft após tratamento por processos oxidativos avançados**. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013, 42p. (Monografia- Tecnologia em Processos Ambientais).

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, 18: 537-544, 1996.

PING, K.Y.; DARAH, I.; YUSUF, U.K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia irta*: An *Allium cepa* Assay. **Molecules**, 17:7782-7791, 2012.

PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M.G.; GARCIAS, G.L. 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**, 20:165-170, 2010.

PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucina sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 55-65, 2001.

POLETTO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), Timbó Amazônico, por meio do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa e Criação**, 10: 163-175, 2011.

PRZEDPELSKA-WASOWICZ, E. M.; WIERZBIKA, M. Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. **Protoplasma**, 48: 663-671, 2010.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Academic Press, London, 1984, 112p.

RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ-UNESP/FUNEP, 1992. 18p.

ROSSATO, L. V.; TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; FARIAS, J. G.; NICOLOSO, F. T. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 82:857-860, 2010.

SILVA, F. D. B.; SALES, M. A. G.; SÁ, O. R. M.; SANTANA, G. M.; DEUS, M. S. M.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M.P; PERON, A. P. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia férrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw. **Revista brasileira de Biociências**, 13:101-109, 2015.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BEZERRA, R. J. A. C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14: 1-3, 2004.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, 26: 551-555, 2003.

VICENTINI, V.E.P. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 23:593-598, 2001.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

*Psychotria ipecacuanha*, possui um complemento diploide de 22 cromossomos, com um cariótipo composto de 7 pares de cromossomos metacêntricos e 4 pares de cromossomos submetacêntricos com fórmula cariotípica de 7M + 4SM. Além disso, apresenta um par de regiões organizadoras nucleolares ativas (RON ativa), na porção telomérica do par de cromossomos “4” e a banda C revelou quatro blocos heterocromáticos.

A população de *P. ipecacuanha* apresenta alto índice meiótico, com valores superiores a 85%, indicando a ocorrência de meiose regular, e independente do corante utilizado, a taxa média percentual de viabilidade polínica é alta, mesmo com diferença significativa entre os corantes utilizados. Evidenciou-se a possibilidade de superestimação da viabilidade polínica pelo método com Lugol e Azul de Astra, recomendando a utilização do Reativo de Alexander, por apresentar fácil distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. E devido a coloração apenas de pólen com atividade respiratória indica-se o TTC 0,30%.

Análise da genotoxicidade e efeito antiproliferativo de *P. ipecacuanha*, analisada por meio do teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum*, revelaram que tanto as decocções das raízes quanto a das folhas possuem efeito genotóxico, uma vez que todas as concentrações causaram alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepae* *Pisum sativum* alto poder antiproliferativo e citotóxico, o que produz um efeito inibitório no ciclo celular dos dois bioindicadores testados. Desta forma, estudos de genotoxicidade, em especial o teste de *Allium cepae* *Pisum sativum*, são uma forma de caracterizar espécies vegetais medicinais ainda pouco conhecidas em relação a seus componentes e atividades de seus extratos, servindo de alerta para a população que se utiliza da medicina popular para o tratamento de doenças. E por possuir alto efeito antiproliferativo e genotóxico, sugere-se um maior cuidado na sua utilização pela população, deste modo indica-se o uso de decocções em concentrações pequenas.