



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS DE ALTAMIRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA LETÍCIA CERQUEIRA DO ROSÁRIO

CITOGENOTOXICIDADE DA *Selaginella amazônica*, Spring

ALTAMIRA-PA
2022

MARIA LETÍCIA CERQUEIRA DO ROSÁRIO

CITOGENOTOXICIDADE DA *Selaginella amazônica*, Spring

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

Orientador(a): Profa. Dra. Magali Gonçalves Garcia
Coorientador(a): Mestra Maiara dos Santos Rodrigues

ALTAMIRA-PA
2022

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

R789c Rosário, Maria Leticia Cerqueira do.
Citogenotoxicidade da *Sellaginella amazonica*, Spring / Maria
Leticia Cerqueira do Rosário. — 2022.
27 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Magali Gonçalves Garcia
Coorientador(a): Profª. MSc. Maiara dos Santos Rodrigues
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, Faculdade de
Ciências Biológicas, Altamira, 2022.

1. Citotóxico. 2. Índice mitótico. 3. Teste Allium Cepa. I.
Título.

CDD 581.35

MARIA LETÍCIA CERQUEIRA DO ROSÁRIO

CITOGENOTOXICIDADE DA *Selaginella amazonica*, Spring

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

Orientador(a):

Prof(a). Dr(a). Magali Gonçalves Garcia
Faculdade de Ciências Biológicas- UFPA

Coorientador(a)

Msc. Maiara dos Santos Rodrigues
Universidade Federal do Pará - UFPA

Banca examinadora:

Msc. Doutoranda Brenda Tayná Sousa da Silva
Faculdade de Ciências Biológicas- UFPA

Prof(a). Dr(a). Tatiana da Silva Pereira
Faculdade de Ciências Biológicas- UFPA

Suplentes:

Prof(a). Dr(a). Flávia Biondi
Faculdade de Ciências Biológicas- UFPA

Prof(a). Dr(a). Aline Andrade de Sousa
Faculdade de Ciências Biológicas - UFPA

ALTAMIRA-PA, 2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ALTAMIRA

PARECER Nº 1 / 2023 - FACCIBIOLO (11.10.04)

Nº do Protocolo: 23073.005799/2023-77

Altamira-PA, 30 de janeiro de 2023.

CITOGENOTOXICIDADE DA ESPÉCIE SELAGINELLA AMAZONICA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas, pela banca examinadora, formado pelos professores:

Orientadora:

Profª. Drª. Magali Gonçalves Garcia
Faculdade de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Tatiana da Silva Pereira
Faculdade de Ciências Biológicas, UFPA

Brenda T. S. Silva
Ma. Brenda Tayná Sousa da Silva

(Assinado digitalmente em 01/02/2023 17:07)
MAGALI GONCALVES GARCIA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CALTA (11.10)
Matrícula: ###843#2

(Assinado digitalmente em 30/01/2023 10:24)
TATIANA DA SILVA PEREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CALTA (11.10)
Matrícula: ###909#0

A Deus, pela graça recebida de chegar a esta etapa, ao meu esposo Anderson, minha orientadora e coorientadora que muito me apoiaram e incentivaram para a conclusão deste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir e me dar forças para chegar até aqui e me permitir concluir esse trabalho.

A Universidade Federal do Pará e a Faculdade de Ciências Biológicas, seu corpo docente e administrativo por me proporcionarem as condições necessárias e tornarem possível a minha formação.

A minha orientadora Magali, por ter muita paciência comigo e me orientar com muita dedicação, por me incentivar e me apoiar, me proporcionando momentos alegres e de muita aprendizagem, tornando tudo mais leve com seu jeitinho doce de limão.

A minha coorientador e colega de laboratório Maiara, por também me orientar com muita paciência e dedicação, por me proporcionar momentos de muitas risadas e muita aprendizagem com todo o seu jeito meigo, certinho e um pouco atrapalhado.

Aos meus pais Vera Lúcia e Clodoaldo, minha avó Joana e principalmente, ao meu esposo Anderson, por nunca sair do meu lado e por sempre me incentivar, me apoiar e me ouvir quando eu mais precisava, aos meus padrinhos João, Adriano e Laleska, que mesmo de longe me incentivaram a não desistir.

A Turma Bio 2018 pela troca de conhecimentos durante esses cinco anos, pelos momentos de festas, comemoração e até mesmo pelos momentos de brigas, que não foram poucos.

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

RESUMO

A floresta amazônica, por ser rica na sua biodiversidade, existe espécies vegetais que ainda não foram estudadas, correndo o risco de serem extintas e com isso levando a perda de compostos químicos que podem ser importantes. Esses compostos químicos são chamados de metabólitos secundários que são produzidos pelas plantas e fundamentais para a sua adaptação e defesa, podendo também serem utilizados na medicina científica e popular, e podem ainda ser úteis para a agricultura na produção de fertilizantes e herbicidas naturais. Não obstante, para que isso seja levado a prática, é necessário que se identifique possíveis riscos toxicológicos associados a essas aplicações. Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial citogenotóxico do extrato aquoso da espécie *Selaginella amazônica*, que é uma samambaia nativa da floresta amazônica. Para a análise do potencial citogenotóxico dessa espécie, foram preparados extratos aquosos nas concentrações de 10mg/ml, 25mg/ml e 50mg/ml, posteriormente submetidos a avaliação por meio do teste *Allium cepa* e comparados com um controle negativo contendo água destilada e um controle positivo contendo glifosato a 15%. Para a realização desses testes, foi avaliado o índice mitótico (IM) e o índice genotóxico (IG). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância de Kruskal-Wallis sendo, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Os resultados mostraram atividade citotóxica na concentração de 50 mg/ml, sendo estatisticamente igual ao controle positivo. Na concentração de 10 mg/ml mostrou um alto IM e conseqüentemente um alto IG em relação a concentração de 50 mg/ml que apresentou baixo IM e baixo IG.

Palavras-chave: Citotóxico, Índice mitótico, Teste *Allium Cepa*.

LISTA DE TABELA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Selaginella amazônica</i> , Spring	11
Figura 2. Sistema teste <i>Allium cepa</i>	12
Figura 3. Esquema de um bioensaio. (Bulbos de cebolas em contato com extrato e suas respectivas concentrações)	14
Tabela 1. Número de células em fases da mitose submetidas ao extrato aquoso de <i>S. amazônica</i> e o índice mitótico (IM) de cada tratamento. IM na vertical seguido por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	16
Figura 4. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetida ao tratamento de 10 mg/ml do extrato aquoso das folhas de <i>S. amazônica</i> . a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase	16
Figura 5. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetida ao tratamento de 25 mg/ml do extrato aquoso das folhas de <i>S. amazônica</i> . a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase	17
Figura 6. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetida ao tratamento de 50 mg/ml do extrato aquoso das folhas de <i>S. amazônica</i> . a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase	17
Figura 7. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetida ao tratamento controle negativo. a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase	17
Figura 8. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetida ao tratamento controle positivo. b. metáfase	17
Tabela 2. Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos tratamentos do extrato aquoso de <i>Selaginella amazônica</i> . IG na horizontal seguido por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	19
Figura 9. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> com alterações cromossômicas submetidas ao controle negativo e concentração de 10 mg/ml do extrato aquoso das folhas de <i>S. amazônica</i> . a. Prófase irregular. b. Metáfase irregular. c. Metáfase com aderência cromossômica. d. Metáfase com perca de cromossômica. e. Metáfase com cromossomo em anel. f. Anáfase irregular. g. Ponte anafásica. h. Anáfase com perca de cromossomos. i. Anáfase com aderência cromossômica. j. Telófase irregular	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 ESPÉCIE SELECIONADA	8
2.3.1 <i>Selaginella amazonica</i>, Spring	8
1.2 FLORESTA AMAZÔNICA	9
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	9
1.3.1 Aplicação dos metabólitos secundários	10
1.4 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	11
1.4.1 Sistema teste <i>Allium cepa</i> L.	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1 COLETA DE DADOS.....	13
3.2 PREPAROS DOS EXTRATOS	13
3.3 BIOENSAIOS	13
3.4 ANÁLISES DOS DADOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
6. REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIE SELECIONADA

1.1.1 *Selaginella amazonica*, Spring

A espécie *Selaginella amazonica*, Spring. (Figura 1), é uma licófito nativa da floresta amazônica com principal distribuição na região norte (Amazonas e Pará). Essa espécie é caracterizada por formar “tapetes” sobre o chão da floresta e pode se espalhar rapidamente, possui caule tetrágono, mais ou menos ereto, ramificado somente na base, folhas caulinares em espiral, crescendo sobre solos com conteúdo intermediário de nutrientes (CASTELLANI & FREITAS, 1992; GÓES-NETO, BARCELLOS & SPINEL, 2020; ZUQUIM, 2008).

Figura 1. *Selaginella amazônica*, Spring.



Fonte: Arquivo pessoal.

Rebello et al. (2003) afirma que algumas espécies do gênero *Selaginella* como a *S. tamariscina*, apresentar atividades antitumorais e antiproliferativo em cultura de células leucêmicas e a *S. moellendorffii* apresenta atividades inibidoras do crescimento de células de adenocarcinoma de ovário, ele afirma também, que ainda não há estudos químicos e/ou biológicos sobre a espécie *S. amazônica*. Por este fato, é importante a realização de estudos para que seja identificado possíveis atividades citogenotóxicas e quais os compostos que são responsáveis por tal atividade.

1.2 FLORESTA AMAZÔNICA

A floresta amazônica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade com mais de 14 mil espécies de plantas (CARDOSO et al., 2017), muitas das quais estão em perigo de extinção devido às diversas atividades humanas que levam à degradação ambiental (TER STEEGE et al., 2013; MMA, 2020).

Com o rápido crescimento da população mundial, grandes áreas da Floresta Amazônica foram colonizadas para obtenção de madeira, criação de pastagens e terras agrícolas, fazendo com que o desmatamento aumentasse drasticamente, acarretando perigo de extinção de espécie vegetais (BRITANNICA, 2019) e que poderiam apresentar compostos químicos importantes para construção de fármacos, herbicidas e fertilizantes naturais.

1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas vasculares apresentam uma ampla variedade de compostos químicos denominados metabólitos secundários que se diferenciam de acordo com a família e a espécie, contribuindo de forma essencial para os odores, sabores e cores específicas das plantas, também, são elementos fundamentais para a interação da planta com o seu ambiente, para adaptação e defesa contra herbívoros e patógenos, bem como uma proteção contra tensões ambientais (YANG, Li et al., 2018; BENNETT & WALLS GROVE, 1994; ZAYNAB et al., 2018).

Os metabólitos secundários são podem ser divididos em três grandes grupos: os terpenóides, fenólicos e os alcalóides que contêm átomos de nitrogênio (CROTEAU et al., 2000).

Os terpenoides é a classe de produtos naturais vegetais mais variados estruturalmente e sua volatilidade fornece para plantas a interação planta-planta, atraindo polinizadores e repelindo insetos. Os monoterpenos, por exemplo, são substâncias voláteis devido seu baixo peso molecular, portanto, denominados óleos essenciais e alguns compostos interessantes são muito utilizados na indústria como aromas, fragrâncias, especiarias (CROTEAU et al., 2000; VIZZOTTO et al., 2010; KABERA et al., 2014).

O grupo dos fenólicos são bastante presentes no nosso dia a dia, pois, seus componentes são responsáveis por dar sabor, odor e coloração a diversos vegetais, sendo atrativos para o homem e muitos outros animais, os quais são atraídos para realizar a polinização ou dispersão de sementes. Esse grupo também possui alguns benefícios para a saúde, pois, são caracterizados por suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias,

anticancerígenas e outras propriedades biológicas, como exemplo, um composto desse grupo chamado de flavonóides são bem conhecidos por terem propriedades medicinais e desempenharem um papel importante nos tratamentos médicos bem-sucedidos desde os tempos antigos por possuir potentes antioxidantes solúveis em água e eliminadores de radicais livres, que previnem danos celulares oxidativos e têm forte atividade anticancerígena (VIZZOTTO et al.,2010; KABERA et al., 2014; JAIN et al., 2019).

Os alcaloides são compostos orgânicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio e é considerada a maior classe de metabólitos secundários. Essa classe de compostos é famosa pela presença de substâncias que causam efeitos no sistema nervoso, sendo muitas delas utilizadas como venenos ou alucinógenos, são conhecidos, também, por terem efeitos farmacológicos e são usados em medicamentos. Como metabólitos secundários, acredita-se que os alcaloides desempenhem um papel defensivo na planta contra herbívoros e patógenos (VIZZOTTO et al.,2010; KABERA et al., 2014; JAIN et al., 2019).

1.3.1 APLICAÇÃO DO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O homem, desde o princípio, fez uso das plantas para diversas finalidades distinguindo-as adequadamente para o uso na alimentação, fins medicinais e farmacológicos (YANG, Li et al.,2018). Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 65 a 80% da população mundial ainda utilizam e confiam muito em plantas e ervas para o uso na medicina tradicional, nas prevenções ou até mesmo no tratamento de doenças (RAHMAN & SINGHAL, 2002). Vários medicamentos fitoterápicos feitos com plantas, microorganismos e fungos foram aprovados nas últimas décadas para uso medicinal (SHAKYA, 2016).

Algumas plantas, além de serem usadas para fins medicinais, também são utilizadas na agricultura para controle de pragas como herbicidas ecologicamente seguros, pois no extrato vegetal há a presença de biomoléculas ativas com potencial inibidor na germinação e/ou crescimento de outros organismos (LENGAI et. al., 2020; TAVARES et al., 2009).

A utilização de herbicidas naturais é um método menos nocivo ao ambiente e aos seres vivos, além de reduzir custos, fazendo que seja oportuna essa utilização para agricultura sustentável, além de existir ainda, muitos estudos para a descoberta de plantas que possam contribuir na produção de herbicida. No Brasil, existe uma diversidade de espécies vegetais que possuem metabólitos secundários com atividade de grande potencial para esse tipo de pesquisa (DE SOUZA; JUNIOR, 2009; LENGAI et. al., 2020).

1.4 CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Alguns fitoquímicos têm a capacidade de causar danos ou alterações na divisão celular quando submetidos a eles, quando causa alterações no índice mitótico este efeito é denominado citotoxicidade (FRESHNEY, 2005; ACAR et al., 2015). Logo é importante estudar as ações dos fitoquímicos a nível celular, entretanto as pesquisas realizadas nos últimos anos relacionadas às atividades alelopáticas referem-se apenas aos impactos que esses compostos causam no crescimento e germinação das plantas (SOUZA FILHO & ALVES, 2000).

No momento em que os fitoquímicos causam danos ou alterações físicas no material genético é denominado de genotoxicidade (FRANCHI, 2012), quando esse efeito apresenta-se no extrato vegetal, pode resultar em alterações cromossômicas, conhecidas também como anomalia cromossômica (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Objetivando analisar o potencial citotóxico e genotóxico em substâncias é possível que se use plantas conhecidas como bioindicadores, tais como *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, que são claros indicadores dos efeitos desses compostos químicos (GUIMARÃES et al., 2000; LEME & MARIN-MORALES, 2009;)

1.4.1 TESTE *ALLIUM CEPA* L.

O teste *Allium cepa* L. foi reconhecido e validado com um ótimo teste para análise e monitoramento *in vitro* de substâncias ambientais pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999). Apesar de terem desenvolvidos vários métodos para a verificação do potencial citotóxico e genotóxico, o teste vegetal *Allium cepa* L. (**Figura 2**) é o mais utilizado em virtude de a espécie possuir grandes cromossomos, por serem fáceis de observar com um microscópio de luz, além de ter muitas vantagens como, realização em curto prazo, baixo custo etc. (BELCAVELLO et al., 2012; BONCIU et al., 2018).

Figura 2. Sistema teste *Allium cepa*.



Fonte: Arquivo pessoal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citogenotóxico do extrato aquoso da espécie *Selaginella amazonica* Spring.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice mitótico de células meristemáticas radiculares em *Allium cepa* sob os efeitos do extrato vegetal das folhas da *S. amazonica*;
- Verificar se o extrato vegetal das folhas da *S. amazonica* é capaz de induzir alterações cromossômicas em células meristemáticas radiculares em *Allium cepa*;
- Classificar e contabilizar as alterações cromossômicas em *Allium cepa* ocasionados pelo extrato vegetal das folhas da *S. amazonica*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE DADOS

Foram coletadas folhas jovens, saudáveis e não danificadas da espécie selecionada, esse material vegetal foi armazenado em sacos plásticos, encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará do *Campus* de Altamira. Após a coleta, de imediato, foi realizada a preparação do extrato.

3.2 PREPAROS DOS EXTRATOS

Para o preparo do extrato aquoso das folhas, o material vegetal da espécie (3800 gramas) foi triturado em liquidificador juntamente com 380mL de água destilada autoclavada, em seguida o material foi filtrado em papel filtro, armazenado em um recipiente de vidro escuro e deixado em descanso por 17 horas.

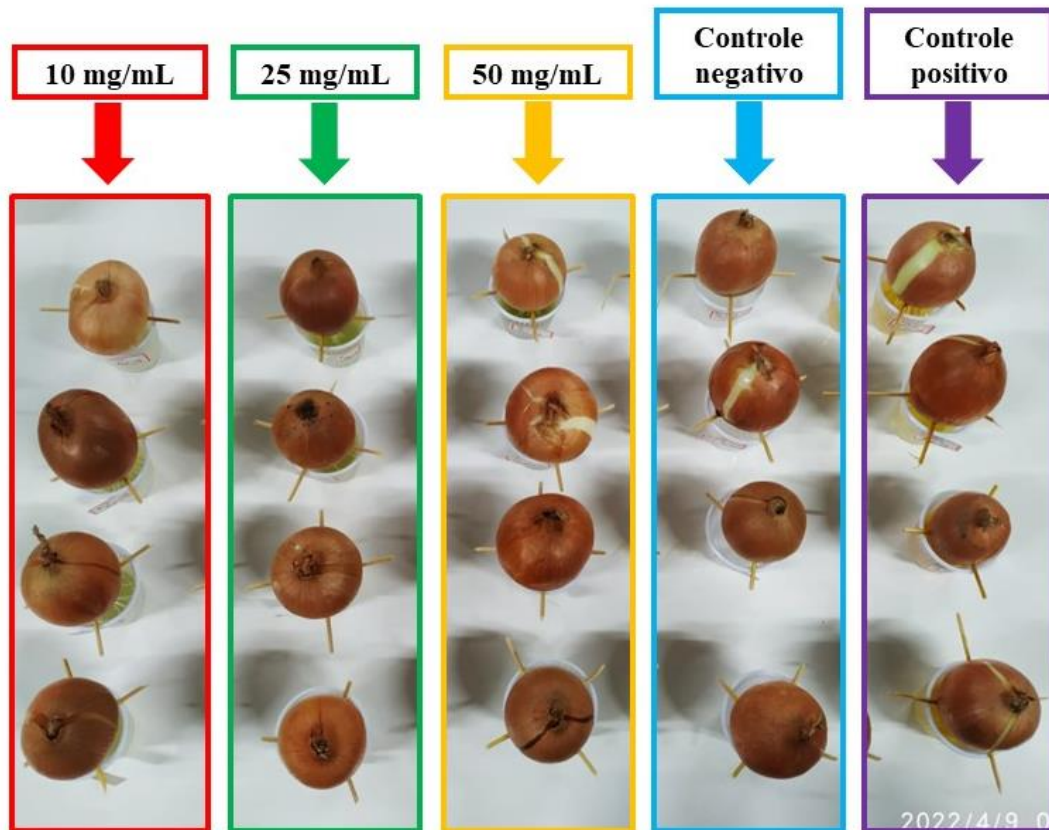
O extrato foi diluído seguindo a proposta de Owolarafe et al. (2020) com modificações. As diluições foram realizadas nas concentrações de 10 mg/L, 25 mg/L e 50 mg/L. Foi utilizado um grupo de controle em água destilada como controle negativo e outro grupo de controle em glifosato 15% como controle positivo (BITTENCOURT, 2010).

3.3 BIOENSAIOS

Foi realizado um bioensaio aplicado ao sistema teste *Allium cepa*. Foram utilizados 30 bulbos de cebola no bioensaio, os quais ficaram três dias em recipientes contendo água destilada autoclavada em processo de enraizamento dentro da B.O.D em uma temperatura de 25°C e os dez bulbos que apresentaram o comprimento radicular com maior diferença após esse período, foram descartados.

Foram utilizados no bioensaio, tratamentos com três concentrações de extrato, somados aos grupos de controle positivo e negativo, e em cada tratamento foi utilizado quatro bulbos previamente submetidos ao enraizamento com água destilada, os mesmos continuaram com as raízes imersas nos tratamentos durante 72 horas na B.O.D em uma temperatura de 25° C (**Figura 3**).

Figura 3. Esquema de um bioensaio. (Bulbos de cebolas em contato com extrato e suas respectivas concentrações)



Fonte: Arquivo pessoal.

Foram retiradas sete raízes de cada bulbo e sujeitos aos procedimentos propostos pela metodologia de Guerra e Souza (2002): colocar em um frasco de vidro com fixador de Carnoy 3:1 por duas horas, lavar duas vezes com água destiladas (5 min. cada lavagem), enxugar as raízes com papel filtro e colocá-las em HCL 5N durante vinte minutos para realizar a hidrólise, lavar novamente três vezes para a retirada completa do HCL (5 Min. cada lavagem), enxugar as raízes com papel filtro e manter em um recipiente fechado com duas gotas de hematoxilina a 1% por 30 minutos, colocar uma raiz em cada lâmina com uma gota de ácido acético a 45% e cobrir com uma lamínula.

Foram observadas 8 lâminas por tratamento, totalizando, 40 lâminas no bioensaio. Foi realizada a observação na lente objetiva de 40x, 3.000 células por tratamento com o de microscópio biológico trinocular, design BX2 da marca Motic Instruments, modelo BA410FL juntamente com a câmera XCAM Family 1080P HDMI+USB Output e o programa computacional ImageView.

3.4 ANÁLISE DE DADOS:

Para contabilizar o índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *Allium cepa* foi calculado a frequência de cada uma das fases da mitose através do cálculo: $IM = (m/T) \times 100$, sendo m = número de células em mitose e T = número total de células. Para contabilizar o índice de alterações cromossômicas foi utilizado a seguinte equação: $IG = (g/T) \times 100$, sendo g = número de células com alterações cromossômicas e T = número total de células (PIRES et al., 2001). Foram submetidos à análise de variância Kruskal-Wallis os resultados dos testes e os resultados das análises foram confrontados pelo teste de Dunnet (MACEDO, 2021). no programa Statistica, versão 8.0 (StatSoft, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

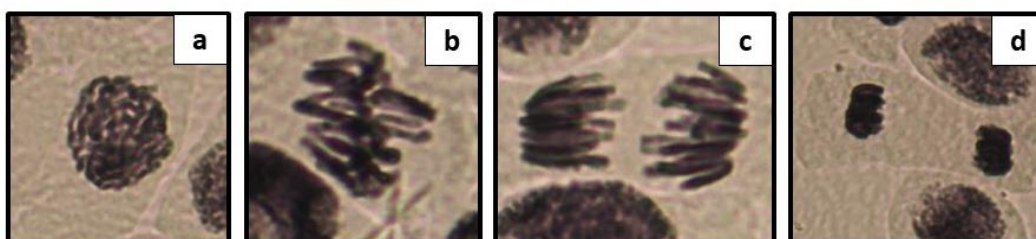
Ao analisar as células meristemáticas de *A. cepa* submetidas às respectivas concentrações do extrato aquoso das folhas de *S. amazônica* e nos controles, foi possível observar que nos tratamentos de concentração 10 mg/mL a fase mitótica mais encontrada foi a prófase, mas também foi possível observar todas as outras fases, já na concentração de 50 mg/mL foi possível observar que a quantidade de prófases e metáfases encontradas foram iguais, nos controles, a fase mais encontrada foi a metáfase. Os números de células em cada fase da divisão celular dentro dos tratamentos estão quantificados na tabela 1.

Tabela 1. Número de células em fases da mitose submetidas ao extrato aquoso de *S. amazônica* e o índice mitótico (IM) de cada tratamento. IM na vertical seguido por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnet.

TRATAMENTOS	INTERFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	IM
10 mg/ml	3033	114	39	37	37	7,51c
25 mg/ml	3078	16	20	17	5	1,26a
50 mg/ml	3768	7	7	5	1	0,56ab
CONTROLE NEGATIVO	3776	29	40	29	13	1,95a
CONTROLE POSITIVO	4669	0	1	0	0	0,01b

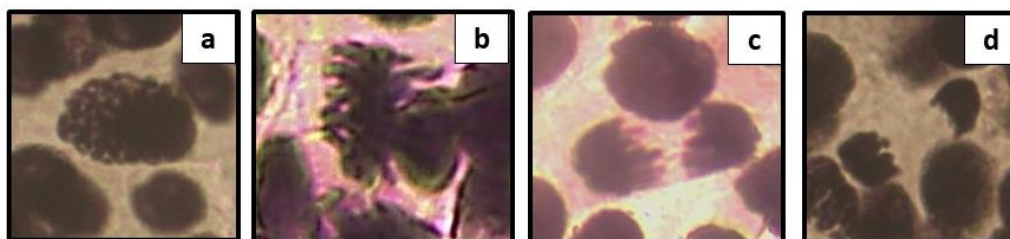
Nos tratamentos 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL e controle negativo foi possível verificar células em diferentes fases da mitose (**Figura 4, 5, 6 e 7**), diferentemente do controle positivo que foi possível observar apenas uma metáfase (**Figura 8**). Ao ser observado o grande índice de prófases nas concentrações de 10 mg/mL, pode-se indicar que possivelmente as próximas fases da mitose foram inibidas (PORTIS et al., 2016).

Figura 4. Células meristemáticas de *A. cepa* submetida ao tratamento de 10 mg/ml do extrato aquoso das folhas de *S. amazônica*. a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase.



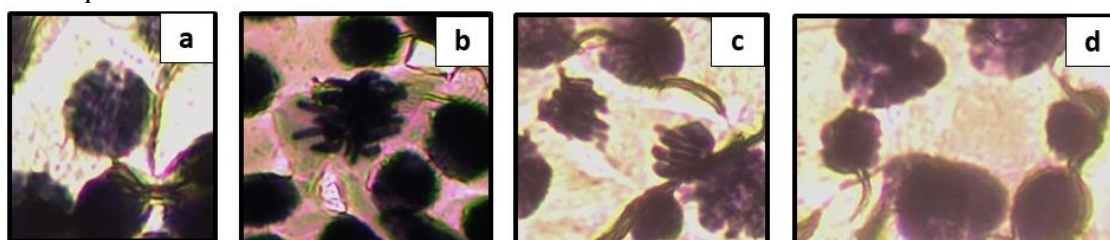
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. Células meristemáticas de *A. cepa* submetida ao tratamento de 25 mg/ml do extrato aquoso das folhas de *S. amazônica*. a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase.



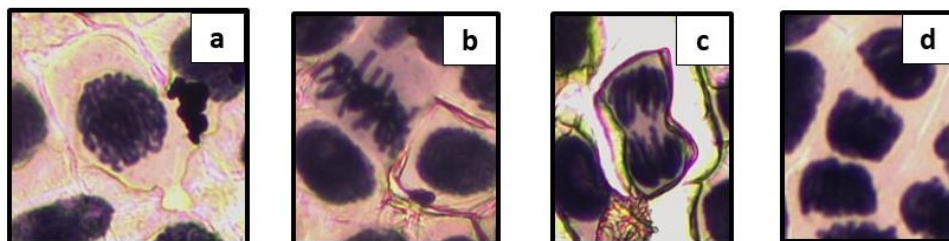
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6. Células meristemáticas de *A. cepa* submetida ao tratamento de 50 mg/ml do extrato aquoso das folhas de *S. amazônica*. a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase.



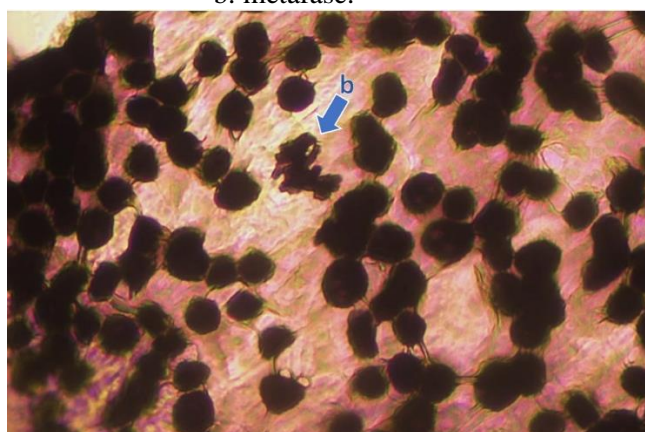
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7. Células meristemáticas de *A. cepa* submetida ao tratamento controle negativo. a. Prófase. b. Metáfase. c. Anáfase. d. Telófase.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8. Células meristemáticas de *A. cepa* submetida ao tratamento controle positivo. b. metáfase.



Fonte: Arquivo pessoal.

Ao realizar as análises do índice mitótico (IM) das células submetidas ao extrato aquoso de *S. amazônica* foi possível observar que o tratamento de 10mg/ml apresentou o maior IM, seguindo do controle negativo e das concentrações de 25 e 50 mg/ml, ambos sendo significativamente diferentes do tratamento de 10 mg/ml. Ocorreu diminuição no IM de acordo com o aumento das concentrações (Tabela 1). Ao avaliar os efeitos citotóxicos do extrato aquoso da *S. amazônica*, foi observado que os resultados foram semelhantes aos resultados do trabalho de Borges et al. (2011), que ao analisar os efeitos citotóxicos do extrato aquoso das folhas secas de *Ricinus communis* o aumento das concentrações promoveu divergência nos índices mitóticos de forma crescente. Quando analisada a concentração de 10 mg/ml, observa-se que o índice mitótico foi maior que o tratamento de controle negativo, no qual utilizamos como referência de IM normal, sendo também, a concentração de 10 mg/ml estatisticamente diferente de todos os tratamentos relacionado ao IM. Trabalho semelhante a este acontecimento é de Younis et. al. (2019) onde seus resultados demonstraram que os tratamentos induziram o aumento do índice mitótico em relação ao controle, podendo servir de subsídio para estudos posteriores na criação de fertilizantes naturais. Pangaribuan et. al. (2019) utilizou fertilizante orgânico derivado de mistura de extratos derivados de folhas de lamtoro, cascas de banana e fibras de coco para observar o crescimento, rendimento, qualidade e absorção de nutrientes do milho doce, obtendo resultados satisfatórios na utilização desse fertilizante natural. Já na concentração de 50 mg/ml, observa-se que o IM é estatisticamente igual ao controle positivo, podendo ser considerado um possível herbicida natural. Ben Kaab et. al. (2020) utilizou o extrato de *C. cardunculus* sobre *T. incarnatum* para avaliar seu potencial herbicida, onde o extrato de *C. cardunculus* afetou o processo de divisão celular e alongamento durante a germinação das sementes de *T. incarnatum*.

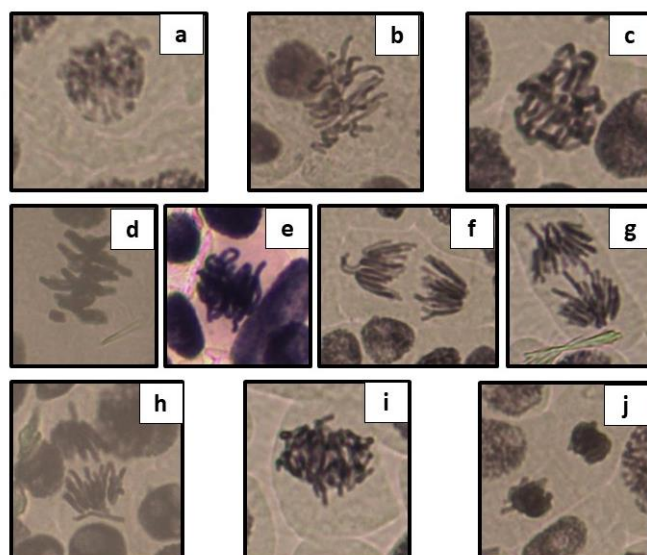
Ao observar as células com alterações cromossômicas submetidas às diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. amazônica*, foram encontradas algumas células com anormalidades mitóticas que estão quantificadas na tabela 2, foi possível observar no tratamento de 10 mg/ml (**Tabela 2 e Figura 9**) o maior índice de anomalias, tendo uma diferença significativa do seu índice de alterações cromossômicas (IG) em relação ao controle negativo.

Tabela 2. Número de células com alterações cromossômicas e o índice de genotoxicidade (IG) submetidas aos tratamentos do extrato aquoso de *Selaginella amazônica*. IG na horizontal seguido por alguma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnet.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	TRATAMENTOS				
	10 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	CONTROLE NEGATIVO	CONTROLE POSITIVO
Prófase irregular	6	2	0	0	0
Metáfase irregular	8	8	2	7	0
Metáfase com aderência cromossômica	16	3	2	17	0
Metáfase com perda cromossômica	1	0	0	1	0
Metáfase com cromossomo em anel	0	0	0	1	0
Anáfase irregular	24	6	0	11	0
Ponte anafásica	6	4	0	5	0
Anáfase com aderência cromossômica	0	1	0	1	0
Anáfase com perda cromossômica	4	0	0	1	0
Telófase irregular	4	0	2	2	0
IG	2,43c	0,58ab	0,03a	1bc	0a

O tratamento de 10 mg/ml, com o maior índice mitótico, apresentou um índice de anomalia cromossômica significante em relação aos outros tratamentos, também sendo estatisticamente igual ao controle negativo. A quantidade de alterações encontradas (**Tabela 2**) mostra que o tratamento de 10 mg/ml teve o maior IG porque o IM também foi alto em relação aos outros tratamentos, inclusive ao controle positivo, que teve o IG 0 pelo fato de o glifosato ser muito citotóxico em plantas ao ponto de não haver células em divisão para serem alteradas (JUNIOR et al.,2002). De acordo com DATTA et al. (2018) a porcentagem de anomalia cromossômica das células aumenta de acordo com o aumento da concentração. As ações dos efeitos genotóxicos de compostos químicos acarretam alterações cromossômicas (GUO et al., 2020).

Figura 9. Células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas submetidas ao controle negativo e concentração de 10 mg/ml do extrato aquoso das folhas de *S. amazônica*. a. Prófase irregular. b. Metáfase irregular. c. Metáfase com aderência cromossômica. d. Metáfase com perca de cromossômica. d. Metáfase com cromossomo em anel. f. Anáfase irregular. g. Ponte anafásica. h. Anáfase com perca de cromossomos. i. Anáfase com aderência cromossômica. j. Telófase irregular



Fonte: Arquivo pessoal.

A formação de ponte cromossômica são alterações estruturais cromossômicas podendo ser atribuída a trocas desiguais que levam à formação de cromossomos dicêntricos que são igualmente puxados em ambos os polos no estágio de anáfase ou da baixa atividade de enzimas de replicação. A formação de cromossomos em anel pode explicada pela produção de duas quebras no mesmo cromossomo e a subsequente união de fragmentos não centroméricos (DATTA et al., 2018; BONCIU et al., 2018).

As alterações mais encontradas foram anáfase irregular e metáfase com aderência cromossômica. A aderência cromossômica pode ocorrer devido à despolimerização do DNA, dissolução parcial de nucleoproteínas, quebra e troca das unidades básicas de fibras dobradas das cromátides e a remoção da cobertura proteica do DNA nos cromossomos, sendo que os cromossomos com aderências é um efeito irreversível e altamente tóxico, que pode ocasionar a morte celular (MERCYKUTTY & STEPHEN, 1980; AHMED, 2018).

Portanto, o extrato aquoso das folhas de *S. amazônica* apresentaram potencial citotóxico e genotóxico na concentração de 50 mg/mL sendo estatisticamente igual ao controle positivo, inibindo a divisão celular, tornando o consumo desse extrato perigoso para a saúde humana e potencial para uso na medicina e na agricultura.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as análises realizadas neste estudo, conclui-se que o extrato aquoso das folhas de *S. amazônica* possui atividade citotóxica na concentração de 50 mg/mL, sendo estatisticamente igual ao controle positivo. O extrato aquoso das folhas de *S. amazônica* possui atividade genotóxica nas concentrações mais altas e apresentou o mais alto índice de atividade genotóxica na concentração mais baixa (10mg/mL) devido a essa concentração ter tido o maior IM. Será necessário que futuros estudos sejam realizados para saber quais os metabólitos secundários são responsáveis pelos resultados vistos nesse trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, MS et al. Nanopartículas de dióxido de titânio induzem citotoxicidade e reduzem o índice mitótico em células humanas derivadas do líquido amniótico. **Toxicologia humana e experimental**, v. 34, n. 1, pág. 74-82, 2015
- AHMED, Bilal e cols. Dano mitocondrial e cromossômico induzido por estresse oxidativo em raízes de *Allium cepa* tratadas com íons Zn²⁺, ZnO-bulk e ZnO-NPs. **Relatórios científicos**, v. 7, n. 1, pág. 1-14, 2017.
- BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.
- BENNETT, R.; WALLSGROVE, R. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BITTENCOURT DE SOUZA, Luccas Fernando et al. Potencial genotóxico de extratos aquosos de *Artemisia verlotorum* no ciclo celular de *Allium cepa*. **Jornal Internacional de Estudos Ambientais**, v. 67, n. 6, pág. 871-877, 2010.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia**. "Floresta amazônica". *Enciclopédia Britânica*, 30 de dezembro de 2019. Disponível: <<https://www.britannica.com/place/Amazon-Rainforest>>, Acessado em 7 de setembro de 2021.
- BONCIU, Elena et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.
- CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999
- CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDER, S.; AMORIM, A. M.; BITTRICH, V.; CELIS, M.; FORZZA, R. C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.
- CASTELLANI, Estela Dalpim; FREITAS, Carlos A. Selaginéláceas da Reserva Florestal Ducke,(Manaus-AM). **Acta Botanica Brasilica**, v. 6, p. 41-48, 1992.
- CROTEAU, Rodney et al. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.
- DATTA, Shivika et al. Avaliação dos efeitos genotóxicos de solos tratados com pesticidas e vermicompostos com o teste de *Allium cepa*. **Pesquisa Ambiental Sustentável**, v. 28, n. 4, pág. 171-178, 2018.

DE SOUZA, R. C. M.; JÚNIOR, W. S. E. Seleção e obtenção de extratos de plantas para utilização no controle de pragas na agricultura familiar. **Revista Agroecossistemas**, v.1, n.1, p. 27-27, 2013.

DOS SANTOS, Jhonatan Guedes et al. Tendências geográficas e déficits de informação na pesquisa conservacionista na Amazônia. **Biodiversidade e conservação**, v. 24, n. 11, p. 2853-2863, 2015.

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

FRESHNEY, R. Ian. Citotoxicidade. **Cultura de células animais: um manual de técnica básica**, 2005.

Góes-Neto, L.A.A.; Barcellos, I.; Spineli, G.; Salino, A. 2020. *Selaginellaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB92049>>. Acesso em: 08 set. 2021

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

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

GUO, Xiaoqing et al. Genetic toxicity assessment using liver cell models: Past, present, and future. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 23, n. 1, p. 27-50, 2020.

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

JAIN, Chitra; KHATANA, Shivani; VIJAYVERGIA, Rekha. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, n. 2, p. 494-504, 2019.

JUNIOR, A; OZELITO Possidônio de et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

KABERA, Justin N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Teste *Allium cepa* em monitoramento ambiental: uma revisão de sua aplicação. **Mutation Research / Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LENGAI, Geraldin MW; MUTHOMI, James W.; MBEGA, Ernest R. Atividade fitoquímica e papel de pesticidas botânicos no manejo de pragas para produção agrícola sustentável. **Africano Científico**, v. 7, p. e00239, 2020.

LOISELEUR, Olivier. Produtos naturais na descoberta de agroquímicos. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 810-822, 2017.

MARÔCO, J. **Análise estatística com o SPSS Statistics**. Report Number, Lda, 2ª ed. p. 298, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Site oficial do Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>. Acesso: Agosto de 2020.

MAHMOOD, Isra et al. Efeitos dos pesticidas no meio ambiente. In: **Planta, solo e micróbios**. Springer, Cham, 2016. p. 253-269.

MERCYKUTTY, V. C; STEPHEN, J. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the Allium test. *Cytologia*, v. 45, n. 4, p. 769-777, 1980.

OWOLARAFE, Tajudeen A. et al. Investigação do potencial de citotoxicidade de diferentes extratos do modelo Allium cepa de folhas de Ziziphus mauritiana (Lam). **Relatórios de Toxicologia**, v. 7, p. 816-821, 2020.

PANGARIBUAN, Darwin H.; SARNO, Sarno; HENDARTO, Kus. Liquid organic fertilizer from plant extracts improves the growth, yield and quality of sweet corn (*Zea mays* L. Var. *Saccharata*). **Pertanika Journal of Tropical Crop Science**, v. 42, n. 3, p. 1157-1166, 2019.

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

Pietrobon, M.R.; Costa, J.M.; Martins, M.B.S. 2020. **Marattiaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB91490>>. Acesso em: 08 set. 2021

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; FILHO, I. A. P.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p.55-65, 2001.

PORTIS, Igor Godinho et al. Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *chochlospermum regium*. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 5, n. 1, 2016.

RAHMAN, SZ; SINGHAL, KC Problemas de farmacovigilância de medicamentos de origem fitoterápica e meios para minimizá-los. **Relatórios de Uppsala**, v. 17, n. Supl, p. 1-4, 2002.

REBELO, M. M. et al. Biflavonóide de *Selaginella amazonica*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3., 2003, Belém, PA.

SALINO, Alexandre; SANTOS FERNANDES, Rozijane; ROBERTO PIETROBOM, Marcio. *Thelypteris amazonica* sp. nov. (Thelypteridaceae) from Amazonian Brazil. **Nordic Journal of Botany**, v. 29, n. 5, p. 611-614, 2011.

Salino, A.; Fernandes, R.S.; Moura, I.O.; Moura, L.C.; Almeida, T.E.; Paixão, L.C. 2020. *Thelypteridaceae* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB582936>>. Acesso em: 08 set. 2021

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

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

StatSoft, Inc. 2008. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

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

TER STEEGE, H.; PITMAN, N. C.; SABATIER, D.; BARALOTO, C.; SALOMÃO, R. P.; GUEVARA, J. E. & MONTEAGUDO, A. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Science**, v. 342, n. 6156, 2013.

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

YANG, Li et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

YOUNIS, M. E.; ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HEIKAL, Y. M. Nanopriming technology enhances vigor and mitotic index of aged *Vicia faba* seeds using chemically synthesized silver nanoparticles. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 393-401, 2019.

ZAYNAB, Madiha et al. Papel dos metabólitos secundários na defesa da planta contra patógenos. **Patogênese microbiana**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZUQUIM, Gabriela et al.; **Guide to the ferns and lycophytes of REBIO Uatamã – Central Amazonia**. 19 ed. Manaus: [s.n.], 2008. 316 p.