



FABIO EDUARDO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO E
CITO-GENOTÓXICO DE DUAS PLANTAS MEDICINAIS:
DAVILLA NITIDA (VAHL) E *DAVILLA ELLIPTICA* (A.ST.HILL)
(DILLENIACEAE)**

LAVRAS – MG

2019

FABIO EDUARDO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO E CITO-GENOTÓXICO DE DUAS
PLANTAS MEDICINAIS:
DAVILLA NITIDA (VAHL) E *DAVILLA ELLIPTICA* (A.ST.HILL) (DILLENACEAE)**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de licenciado.

Prof. DSc. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Coordenadoria de Processos Técnicos
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Santos, Fabio Eduardo dos

Avaliação do potencial fitotóxico e cito-genotóxico de duas plantas medicinais : *Davilla nitida* (Vahl) e *Davilla elliptica* (A.ST.Hill) (Dilleniaceae) / . – Lavras : UFLA, 2019.

35 p. : il.

TCC(Graduação)–Universidade Federal de Lavras, 2019.

Orientadora: Prof. DSc. Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Bibliografia.

1. Cito-genotoxicidade. 2. Vegetais Superiores. 3. *Lactuca sativa*. I. Larissa Fonseca Andrade Vieira. II. Título.

FABIO EDUARDO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO E CITO-GENOTÓXICO DE DUAS
PLANTAS MEDICINAIS: *DAVILLA NITIDA* (VAHL) E *DAVILLA ELLIPTICA* (A.ST.HILL)
(DILLENACEAE)**

**ASSESSMENT OF THE PHYTOTOXIC AND CYTO-GENOTOXIC POTENTIAL OF
TWO MEDICINAL PLANTS: *DAVILLA NITIDA* (VAHL) AND *DAVILLA ELLIPTICA*
(A.ST.HILL) (DILLENACEAE)**

Monografia apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do curso
de Ciências Biológicas, para obtenção do título
de licenciado.

APROVADA em 27/06/2019.

Prof. DSc. Larissa Fonseca Andrade Vieira UFLA
Prof. DSc. Daniel Rinaldo UNESP
Prof. DSc. Elisa Monteze Bicalho UFLA

Prof. DSc. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Dedico à minha família, responsáveis pela maior herança da minha vida: meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras, pelo curso e a estrutura fornecidas para uma excelente formação profissional.

A todos os professores com que tive o prazer de ter aula, vocês são minha inspiração.

A professora Dr^a Larissa Fonseca Andrade Vieira pelo acolhimento, confiança e crescimento profissional e pessoal proporcionado.

A todos do Laboratório de Citogenética Vegetal, em especial aos membros do grupo de pesquisa “Citotox”, pelo convívio e amizade.

A todos os amigos do “Brejão”, em especial Carlos, Daniel, Henrique, Kassius. Vocês tornaram essa bagunça toda suportável.

Aos companheiros do 210 pelo convívio.

Aos bons amigos que fiz no curso de biologia, Felipe, Gabriel, Violeta, LG, Maria Gabriela, Mateus Cardoso, Andressa, Gisele e Carol.

Aos meus pais, Zélia e Wilton, por tudo que representam na minha vida. Vocês são meu orgulho e inspiração.

A minha irmã, Patrícia, e o pequeno Brian.

A Natália, a melhor companheira que eu podia querer, que esteve ao meu lado em todos os momentos.

E a todos que de uma forma ou de outra deram uma ajudinha para que esse momento fosse possível.

Os grandes navegadores devem sua reputação aos temporais e tempestades.
(Epicuro)

RESUMO

O uso de plantas pelo ser humano no tratamento de enfermidades remonta há vários milênios. Nos dias atuais mesmo com os medicamentos alopáticos á disposição, milhares de pessoas fazem uso de plantas para o controle de enfermidades. Apesar de no senso comum essa ser uma alternativa mais segura, a evidencia científica demonstra que plantas medicinais podem ter efeitos tóxicos. Com isso o presente trabalho teve por objetivo acessar o potencial fitotóxico, citotóxico e genotóxico de duas plantas do cerrado brasileiro, usadas na medicina popular, *Davilla nitida* e *Davilla elliptica*. Para tanto foram realizado ensaios de germinação, crescimento e análise do ciclo celular, utilizando o modelo vegetal *Lactuca sativa*. O teste de germinação mostrou efeito fitotóxico significativo para ambas as espécies nas duas maiores concentrações, enquanto no teste de crescimento nenhuma espécie apresentou efeitos significativos. Nas análises microscópicas fica claro a ação aneugênica e citotóxica de *D. elliptica*, enquanto *D. nitida* mostrou maior ação clastogênica e indução de micronúcleos, sugerindo que os danos causados por esse extratos não estão sendo nem reparados nem levam a apoptose, o que os faz passar para a geração seguinte de células na forma de micronúcleos. Essas diferenças na ação das duas espécies provavelmente não se dá por diferenças qualitativas na composição dos extratos, pois ambos são muitos parecidos, mas por diferenças quantitativas e pelas interações sinérgicas e antagonísticas entre os compostos presentes nos extratos

Palavras-chave: Bioensaios. Vegetais Superiores. *Lactuca sativa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Efeitos dos extratos hidroalcoólicos de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i> na germinação de sementes de <i>L. sativa</i>	17
Figura 4.2 – Crescimento de radículas de <i>L. sativa</i> após 48h de exposição às diferentes concentrações dos extratos das duas espécies de <i>Davilla</i>	18
Figura 4.3 – Distribuição das alterações cromossômicas de células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas as diferentes concentrações dos extratos das espécies de <i>Davilla</i>	22
Figura 4.4 – Fases do ciclo mitótico de células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas as diferentes concentrações dos extratos das espécies de <i>Davilla</i>	23
Figura 5.1 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas aos extratos de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i>	26
Figura 5.2 – Anormalidades observadas em células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas aos extratos de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Alterações no ciclo celular de células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas as diferentes concentrações dos extratos de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i>	20
Tabela 4.2 – Frequência de alterações clastogênicas, aneugênicas e aderência cromossômica em células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas as diferentes concentrações dos extratos de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i>	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Toxicidade de plantas medicinais	10
2.2	O gênero <i>Davilla</i> Vand	10
2.3	Bioensaios utilizando vegetais superiores	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Obtenção dos extratos vegetais	14
3.2	Ensaio de germinação e crescimento inicial da plântula	14
3.3	Análises microscópicas	15
3.4	Análise Estatística	15
4	RESULTADOS	17
4.1	Análises Macroscópicas	17
4.2	Análises Microscópicas	18
5	DISCUSSÃO	24
5.1	Análises macroscópicas	24
5.2	Análises microscópicas	25

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no combate a enfermidades acompanha a humanidade desde de tempos imemoriais. Apesar de seu uso ter diminuído graças a ascensão dos medicamentos sintéticos, plantas com propriedades medicinais ainda são bastante usadas, principalmente em locais com pouco acesso a medicamentos tradicionais, como moradores de zonas rurais e povos e comunidades tradicionais.

No imaginário popular, medicamentos naturais são vistos possuírem menor risco associado, ou até mesmo não possuir riscos, em comparação a medicamentos tradicionais. Porém diversos medicamentos farmacêuticos têm sua origem em plantas ou são sintetizados tendo por base substâncias naturais existentes. Os efeitos adversos advindos do uso de preparações de plantas medicinais, segundo registros da literatura podem incluir efeitos adversos como reações alérgicas, desde dermatite transitória até choque anafilático (ERNST, 1998), toxicidades específicas como hepatotoxicidade (ARSECULERATNE; GUNATILAKA; PANABOKKE, 1981) e genotoxicidade (SOUSA; SILVA; VICCINI, 2010).

Davilla nitida e *Davilla elliptica*, conhecidas popularmente como “sambaibinha” e “pau-de-bugre” respectivamente, são espécies pertencentes a família Dileniaceae, que ocorrem no território brasileiro. Ambas são usadas por povos locais para tratamento de diversas enfermidades. O conhecimento atual do potencial tóxico de plantas medicinais no geral e destas espécies em particular ainda é bastante limitado. Por isso a necessidade da condução de estudos que visem a prospecção desse potencial, além da determinação do mecanismo de ação e dos potenciais compostos presentes na planta que podem estar relacionado a efeitos tóxicos.

Bioensaios usando vegetais superiores são utilizados para a prospecção inicial de potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de uma diversa gama de compostos. Estes testes se destacam devido a apresentarem baixo custo, serem rápidos e fáceis de serem executados e apresentarem boa correlação com outros modelos, como mamíferos (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Ademais, segundo a Universalidade da organização do genoma, se, uma substância é capaz causar danos ao DNA de células vegetais, ela tem potencial para danificar o DNA de células humanas (GRANT, 1978).

Diante do exposto o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade fitotóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica dos extratos hidroalcoólicos de *D. nitida* e *D. elliptica* por meio de bioensaios utilizado o modelo vegetal *Lactuca sativa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Toxicidade de plantas medicinais

Entre as espécies vegetais responsáveis por intoxicações no Brasil, 62% são plantas usadas para o tratamento de enfermidades. A população do meio rural está particularmente exposta a intoxicações dessa natureza pelo difícil acesso a medicamentos tradicionais, respondendo por 19,47% dos casos de intoxicação por plantas registrados no Brasil. Contudo os números relativos a este tipo de intoxicação ainda são subestimados. As intoxicações agudas são as que geralmente chegam aos serviços de atendimento de postos de saúde, enquanto as intoxicações crônicas, na maioria dos casos, são difíceis de se estabelecer uma relação entre os sintomas observados e o consumo (CAMPOS et al., 2016).

Para George (2011), em termos de segurança para o uso humano plantas medicinais podem ser divididas em três grupos. O primeiro grupo é constituído de plantas que possuem quantidades consideráveis de compostos venenosos, e que não devem portanto, serem administradas por pessoas não qualificadas. Exemplos são *Atropa belladonna*, *Arnica spp.*, *Aconitum spp.*, *Digitalis spp.*. O segundo grupo são plantas que podem apresentar efeitos adversos como náuseas ou vômitos, que devido ao seu poderoso mecanismo de ação, mas são seguras para uso se usadas em condições apropriadas. *Lobelia inflata* e *Eonymus spp.* são exemplos desse grupo. O terceiro grupo é composto de plantas que possuem algum tipo específico de toxicidade, como a hepatotoxicidade de plantas contendo o alcalóide pirrolizidina (MATTOCKS, 1968). Tem sido reportado também crescentemente efeito citogenotóxico e mutagênico de diversas plantas usadas na medicina tradicional (AMADI et al., 2018; REGNER et al., 2011; SHIN et al., 2011). Já foram identificadas plantas medicinais com atividade citotóxico, como *Solanum lycocarpum* (VIEIRA et al., 2010), genotoxicidade, como por exemplo *Cymbopogon citratus* (SOUSA; SILVA; VICCINI, 2010) e mutagenicidade, como *Smilax campestris* (FERREIRA; VARGAS, 1999).

2.2 O gênero *Davilla* Vand

Davilla Vand é um gênero neotropical, composto de arbustos ou lianas, pertencente a família Dilleniaceae e possui cerca de 30 espécies distribuídas desde o México até o sul do Brasil (Santa Catarina), Bolívia e Paraguai (BRUNIERA; GROppo, 2010). Várias espécies desse gênero são utilizadas para tratamento de enfermidades. *Davilla nitida* (Vahl) é uma liana

distribuída pela América Central e América do Sul. No Brasil, está presente em matas de galeria no sul do Amazonas e em regiões de cerrado (BRUNIERA; GROppo, 2010). É chamada popularmente de sambaibinha ou lixeirinha de rama. Na medicina popular é bastante usada no para o tratamento de úlceras gástricas (BISO, 2008). *Davilla elliptica* (A.St.Hil) é um arbusto de ocorrência na Bolívia e no Brasil, a espécie ocorre no cerrado, preferencialmente como arbustos de baixo porte (BRUNIERA; GROppo, 2010). Segundo Rodrigues e Carvalho (2001) na região do alto Rio Grande, em Minas Gerais, o uso dessa planta é reportado por moradores locais como tendo propriedades de adstringente tônico e laxativo. O banho realizado com as folhas frescas da planta é indicado em casos de linfatismo, inchações e orquites (BISO, 2008).

A literatura oferece algumas informações a respeito da composição química dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*. Dentre os compostos encontrados em plantas do gênero *Davilla*, se destacam a presença de flavonóides, com destaque para a miricetina, quercetina e seus derivados. Gurni e Kubitzki (1981) investigaram a composição de flavonóides em plantas do gênero *Davilla* para fins filogenéticos. Nas folhas de *D. nitida* esse estudo acusou a presença de miricetina, miricetina 3–ramnosídeo (miricitrina), miricetina 3–galactosídeo, quercetina e quercetina 3–ramnosídeo (quercitrina). Além desses cinco já citados *D. elliptica* apresentou também kaempferol, miricetina 3–arabinosídeo, quercetin 3–glicosídeo, prodelfinidina e procianidina. Além disso, sabe-se que ambas as espécies também possuem quercetina 3–*O*– α –*L*–ramnopiranosídeo e miricetina 3–*O*– α –*L*–ramnopiranosídeo e ácido gálico (RODRIGUES et al., 2008). Lima, Lemos e Conserva (2014) encontraram através de sua prospecção fitoquímica a presença nos extratos metanólicos de *D. nitida*, além de alguns já citados, de myricetin 3–*O*– β –galactopiranosídeo. Derivados do ácido fenólico, acil-glicoflavonóides e taninos condensados foram encontrados nos extratos metanólicos de ambas as espécies. Essas informações apontam para uma semelhança na composição química das duas espécies, em termos qualitativos. Essa afirmação é também feita por Biso et al. (2010).

2.3 Bioensaios utilizando vegetais superiores

Bioensaios usando modelos vegetais são testes já reconhecidos para a detecção de atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica de uma diversa gama de compostos (GRANT, 1999). Estes testes apresentam alta sensibilidade, baixo custo, são rápidos e fáceis de serem executados (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Além disso, esses testes permitem acessar diversos endpoints possíveis de se analisar, o que permite que várias inferências possam ser feitas com re-

lação ao mecanismo de ação do composto analisado. A análise da porcentagem de germinação, e do crescimento radicular permitem dizer se o composto é fitotóxico (ARAGÃO et al., 2015). Alterações no índice mitótico, e aumento da frequência de núcleos condensados refletem ação citotóxica do composto, a observação de alterações cromossômicas permite a identificação de ação clastogênica e/ou aneugênica, enquanto a indução de micronúcleos sugere uma possível ação mutagênica do composto (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Lactuca sativa L. apresenta muitas características que a tornam um excelente modelo para testes de prospecção de fitotoxicidade em testes de germinação e crescimento, como germinação rápida e uniforme, o que garante a obtenção dos dados sem atrasos (TIGRE et al., 2012). Segundo revisão de Reigosa et al. (2013) a grande maioria dos estudos em alelopatia conduzidos no Brasil, usavam *L. sativa* como espécie modelo. A análise do ciclo celular para detecção de potencial tóxico foi proposto primeiramente por Levan (1938), que observou o efeito da colchicina em células meristemáticas de *Allium cepa* L.. Após isso esse modelo vegetal vem sendo amplamente usado para a detecção de efeito tóxico dos mais variados tipos de compostos, como por exemplo, resíduos industriais (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009), metais pesados (BORBOA; TORRE, 1996; SETH et al., 2008), pesticidas (BOLLE et al., 2004; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009) e extratos vegetais (AKINBORO; BAKARE, 2007; PING et al., 2012). Porém recentemente *L. sativa* vem sendo crescentemente usada, também para este tipo de análise do ciclo celular. Nos últimos anos diversos estudos têm sido publicados empregando-a para a prospecção de efeitos tóxicos principalmente de óleos essenciais e extratos vegetais (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; ARAGÃO et al., 2017; SANTOS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2013), mas também outros tipos de compostos como pesticidas (COSTA et al., 2017), metais pesados (SILVA et al., 2017), resíduos industriais (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010) e até resíduos do processamento do café (AGUIAR; ANDRADE-VIEIRA; DAVID, 2016). O já assentado teste do *A. cepa* e o teste de alterações cromossômicas com *L. sativa* foram comparados por Silveira et al. (2017) que concluíram que ambos eram eficazes para a detecção da toxicidade de poluentes ambientais. Porém enquanto *A. cepa* foi mais eficaz para a detecção de danos clastogênicos, *L. sativa* se mostrou mais sensível a danos aneugênicos.

Uma preocupação com testes usando vegetais é a correlação com outros testes em mamíferos, pois a principal motivação em determinar o potencial tóxico de compostos é a preocupação com relação a saúde humana. Fiskesjö (1985) já apontava a boa correlação do teste *A.*

cepa com testes em mamíferos. E cada vez mais esse teste vem sendo mostrado apresentar boa correlação com testes em leucócitos humanos (PALMIERI et al., 2016). Da mesma forma essa mesma correlação já foi também reportada para o teste com *L. sativa* (REIS et al., 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos vegetais

Folhas secas de *D. nitida* e *D. elliptica* passaram por uma divisão grosseira seguida por pulverização realizada em moinho de facas. O material obtido foi submetido à maceração com etanol 70%. Uma quantidade do pó foi imersa em uma mistura extratora de etanol/água (7:3) na proporção 1:10 (material vegetal/mistura extratora) durante 120 horas. A mistura extratora foi substituída a cada 24 horas. Após a extração, os líquidos extratores foram evaporados em evaporadores rotativos sob pressão reduzida, em temperatura menor que 50° C. O extrato foi transferido para um vidro tarado e deixado em capela até a completa eliminação do solvente. Posteriormente, estes foram liofilizados para completa remoção da água, armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulado e a partir de então, foram realizadas diluições em água nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 g·L⁻¹, para assim serem utilizadas nos análises macroscópicas e microscópicas.

3.2 Ensaios de germinação e crescimento inicial da plântula

Foram montadas placas de petri contendo papel-filtro embebido em 3 ml dos extratos onde foram dispostas 50 sementes de *Lactuca sativa* L.. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de cinco repetições para cada tratamento e como controle negativo foi usado água destilada. As placas foram então cobertas com papel-alumínio a fim de evitar a influência de luz (NARWAL; SAMPIETRO; CATAÁN, 2008) e mantidas em câmara de germinação (B.O.D.) a 24° (±) 2° C por 48 h. Após 8, 16, 24, 32, 40 e 48 h de exposição aos extratos, foi acessado o número de sementes germinadas em cada placa de petri. A partir desses dados foram obtidos a cada tratamento a razão de germinação (RG) que é a porcentagem de sementes germinadas, o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo as fórmulas:

$$RG = NT \times 100/N \quad (3.1)$$

Onde NT é o número de sementes germinadas para cada tratamento ao final do experimento e N é o número total de sementes.

$$IVG = (N8h \times 1) + (N16h - N8h) \times \frac{1}{2} + (N24h - N16h) \times \frac{1}{4} + (N32h - N24h) \times \frac{1}{8} + (N40h - N32h) \times \frac{1}{16} + (N48h - N40h) \times \frac{1}{32} \quad (3.2)$$

Onde N8h, N16h, N24h, etc., se refere ao número de sementes germinadas após 8, 16, 24 horas após o início do experimento, respectivamente.

Após as 48 h de exposição, com auxílio de paquímetro digital, as radículas emitidas foram medidas e então coletadas e fixadas em Carnoy (etanol, ácido acético na proporção de 3:1) para serem usadas nas análises microscópicas.

3.3 Análises microscópicas

Para o preparo das lâminas as radículas coletadas no item 3.2 passaram por 3 lavagens de 5 min em água destilada, sendo submetidas, depois disso, à hidrólise ácida em ácido clorídrico 1N por 10 min. Após, foi adicionado água destilada gelada afim de parar a hidrólise. As radículas foram coradas pela reação de Feulgen (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924), sendo expostas por uma hora e meia ao reativo de schiff em recipiente protegido da luz. Após essa exposição as radículas foram transferidas para um recipiente com água da torneira, para então serem preparadas as lâminas pela técnica do esmagamento, quando foi também adicionado uma gota de carmim acético 2%. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e secas para que fosse adicionado Entellan® para a obtenção de lâminas permanentes. As mesmas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico Olympus CX 41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) usando objetiva de 40x. Desse modo foram acessados os seguintes parâmetros: índice mitótico (IM), a frequência das alterações cromossômicas totais (AT), núcleos condensados (NC), micronúcleos (MCN) e células binucleadas (CBN).

3.4 Análise Estatística

Todas as análises foram feitas utilizando o software de código aberto R, na versão 3.6.0 (R CORE TEAM, 2019). Os parâmetros obtidos nas análises macroscópicas e microscópicas passaram por análise de variância (ANOVA). Foi testada a normalidade da distribuição dos re-

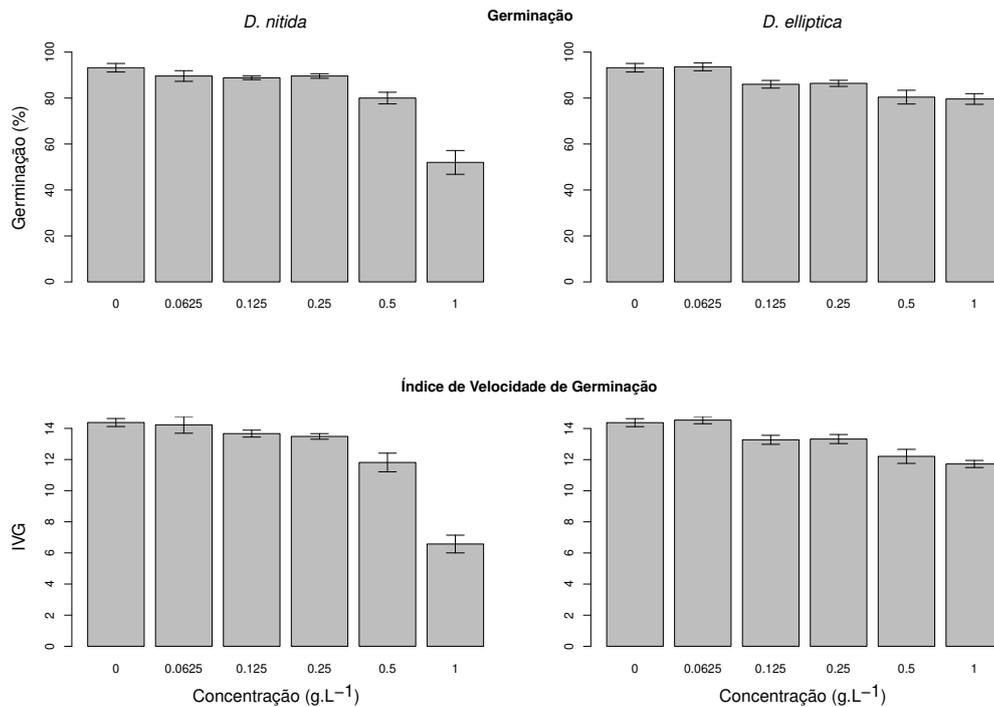
síduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade pelo teste de Levene. Os parâmetros que não apresentaram distribuição normal dos resíduos da ANOVA foram transformados pelo uso da função *Normalize* do pacote *QuantPsyc* (FLETCHER, 2012). As médias dos tratamentos foram comparadas com o controle negativo pelo teste de Dunnett (DUNNETT, 1955).

4 RESULTADOS

4.1 Análises Macroscópicas

Para os testes de germinação de sementes de *L. sativa* expostas aos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*, ambos os extratos induziram reduções significativas na RG a partir da concentração de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo essa redução mais expressiva para os extratos de *D. nitida* (Figura 4.1). O IVG mostrou o mesmo padrão que a RG sofrendo inibição significativa nas duas maiores concentrações e da mesma forma sendo mais pronunciados nos extratos de *D. nitida*.

Figura 4.1 – Efeitos dos extratos hidroalcoólicos de *D. nitida* e *D. elliptica* na germinação de sementes de *L. sativa*.

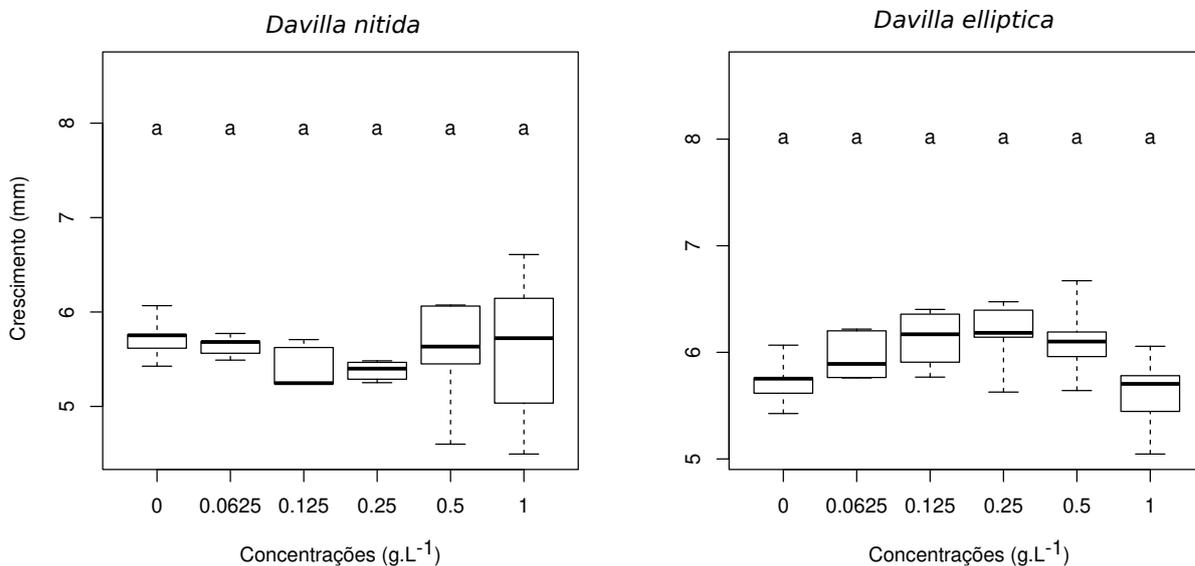


Médias comparadas com o controle negativo pelo teste de Dunnett: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Fonte: Do Autor (2019)

O teste de crescimento das plântulas de *L. sativa* após 48 h. de exposição aos extratos não mostrou alterações significativas em nenhuma concentração de ambos extratos (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Crescimento de radículas de *L. sativa* após 48h de exposição às diferentes concentrações dos extratos das duas espécies de *Davilla*.



Médias comparadas com o controle negativo pelo teste de Dunnett: Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente.

Fonte: Do Autor (2019)

4.2 Análises Microscópicas

A partir das análises da atividade dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*, os principais efeitos observados no ciclo celular de células meristemáticas de radículas de *L. sativa* são expostos na Tabela 1.

O índice mitótico não apresentou alterações significativas em nenhuma concentração dos extratos de ambas as espécies. As frequências de cada fase do ciclo celular também foi acessada (Figura 4.4). Pode se observar que o extrato de *D. nitida* provocou um pronunciado aumento de telófases a cada concentração, enquanto a frequência de anáfases apresentou diminuição. O extrato de *D. elliptica* apresentou menores alterações das frequências das fases do ciclo em relação ao extrato de *D. nitida*, porém é possível observar um aumento da frequência de metáfases e uma leve diminuição de prófases.

Os extratos de *D. nitida* induziram aumento significativo ($p < 0,01$) de alterações cromossômicas já na menor concentração. A partir da concentração de $0,125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ os efeitos foram ainda mais significativos ($p < 0,001$). Os extratos dessa espécie induziram aumento significativo ($p < 0,05$) de núcleos condensados apenas na maior concentração. A observação de micronú-

cleos foi significativa ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas. Este extrato também foi o único a induzir o aparecimento de células binucleadas já na concentração de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Já para os extratos de *D. elliptica* as alterações cromossômicas não foram significativas na menor concentração, embora na concentração de $0,125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ o foram a um nível de significância de $p < 0,01$ e a partir da concentração de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a significância foi ainda maior ($p < 0,001$). A frequência de núcleos condensado já foi significativa ($p < 0,05$) nas menores concentrações, sendo ainda mais expressiva nas duas maiores concentrações ($p < 0,001$). E a frequência de micronúcleos foi significativa ($p < 0,05$) apenas na maior concentração (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Alterações no ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa* expostas as diferentes concentrações dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*.

	Concentrações (g.L ⁻¹)	IM(%)	AT(%)	NC(%)	MCN(%)	CBN(%)
Controle	0	8,129 ± 0,437	0,114 ± 0,114	0,545 ± 0,492	0,038 ± 0,049	0,000 ± 0,000
	0,0625	7,687 ± 0,949	0,373 ± 0,180**	0,649 ± 0,607	0,428 ± 0,195***	0,020 ± 0,063
	0,125	7,534 ± 1,071	0,506 ± 0,329***	0,558 ± 0,597	0,509 ± 0,482***	0,106 ± 0,108
	0,25	7,844 ± 0,713	0,485 ± 0,376***	0,586 ± 0,494	0,546 ± 0,170***	0,148 ± 0,142*
	0,5	7,267 ± 1,218	0,485 ± 0,241***	0,980 ± 0,645	0,417 ± 0,209***	0,186 ± 0,149***
<i>D. nitida</i>	1	8,012 ± 0,609	0,577 ± 0,309***	1,271 ± 0,655*	0,617 ± 0,367***	0,151 ± 0,119***
	0,0625	7,346 ± 0,563	0,233 ± 0,168	2,276 ± 1,201*	0,088 ± 0,085	0,000 ± 0,000
	0,125	7,78 ± 0,894	0,422 ± 0,185**	2,335 ± 0,984*	0,107 ± 0,128	0,000 ± 0,000
	0,25	7,733 ± 0,647	0,563 ± 0,215***	2,328 ± 1,004*	0,059 ± 0,069	0,000 ± 0,000
	0,5	7,554 ± 0,645	0,524 ± 0,197***	3,209 ± 2,018***	0,127 ± 0,153	0,000 ± 0,000
<i>D. elliptica</i>	1	7,989 ± 0,676	0,697 ± 0,304***	2,979 ± 1,581***	0,165 ± 0,139*	0,000 ± 0,000

Médias comparadas com o controle negativo pelo teste de Dunnett: * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001). Abreviações: IM – Índice mitótico, AT – alterações cromossômicas totais, NC – núcleos condensados, MCN – micronúcleo, CBN – célula binucleada.

Fonte: Do autor (2019)

As alterações cromossômicas observadas foram: C metáfase, cromossomo atrasado, cromossomo perdido, cromossomo não orientado, cromossomo aderente, quebra e ponte cromossômicas (Figura 4.3). As frequências de todas as alterações aneugênicas (AA), clastogênicas (AC) e aderência cromossômica (AD) também foram quantificadas (Tabela 4.2). Apesar das alterações totais induzidas pelo extrato de *D. nitida* terem sido significativas na menor concentração, quando separadas pelo tipo de alteração, apenas as alterações clastogênicas e a aderência cromossômica apresentaram aumento significativo na maior concentração (respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,01$). Alterações aneugênicas não foram significativas para esse extrato. O extrato de *D. elliptica* induziu aumento maior de aderência cromossômica sendo significativo ($p < 0,05$) já na concentração de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo maior na maior concentração ($p < 0,001$). As alterações clastogênicas não mostraram aumento significativo em nenhuma concentração, por outro lado esse extrato apresentou um pronunciado efeito aneugênico mostrando aumento significativo desse tipo de alteração já na concentração de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($p < 0,001$).

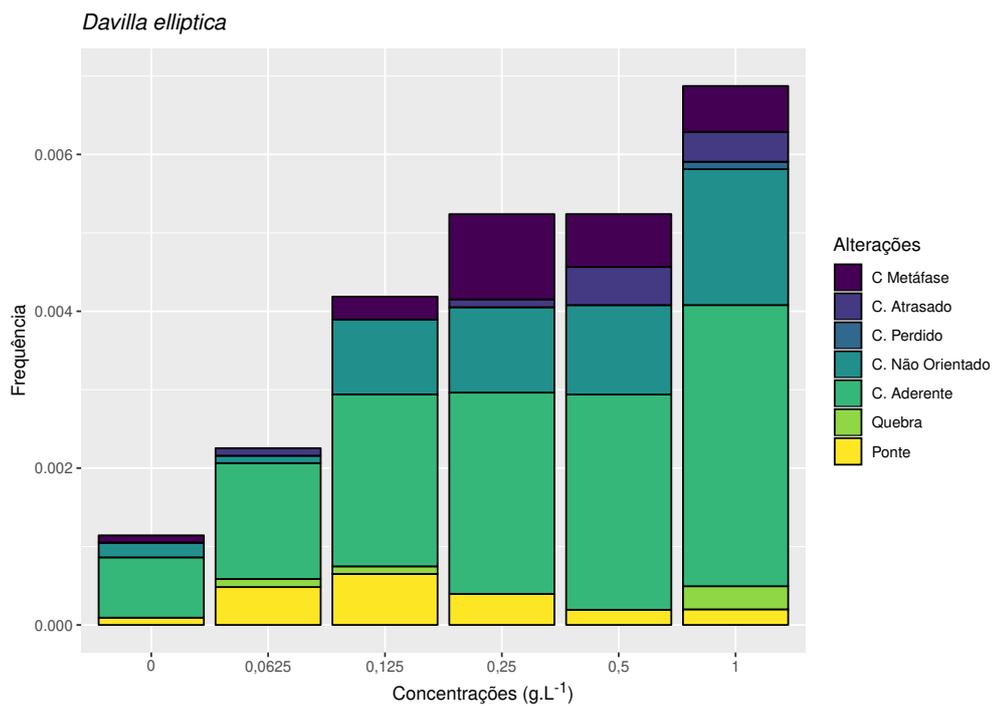
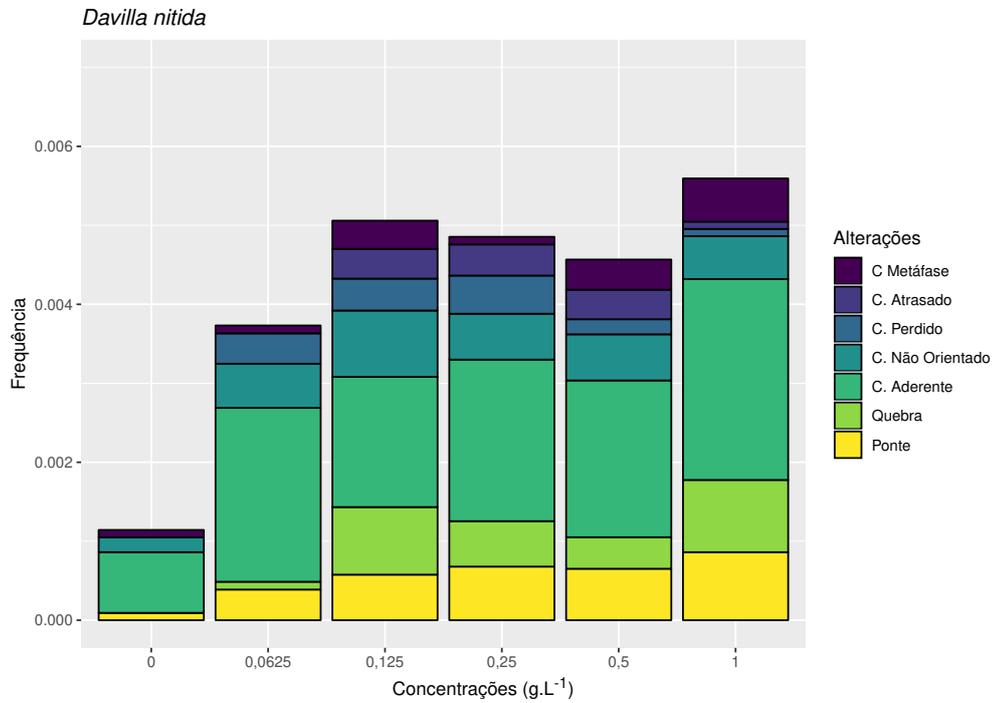
Tabela 4.2 – Frequência de alterações clastogênicas, aneugênicas e aderência cromossômica em células meristemáticas de *L. sativa* expostas as diferentes concentrações dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*.

	Concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	AA (%)	AC (%)	AD (%)
Controle	0	$0,028 \pm 0,063$	$0,009 \pm 0,029$	$0,077 \pm 0,098$
<i>D. nitida</i>	0,0625	$0,104 \pm 0,083$	$0,049 \pm 0,096$	$0,220 \pm 0,145$
	0,125	$0,198 \pm 0,198$	$0,143 \pm 0,146$	$0,165 \pm 0,103$
	0,25	$0,155 \pm 0,199$	$0,125 \pm 0,139$	$0,205 \pm 0,109$
	0,5	$0,162 \pm 0,161$	$0,105 \pm 0,097$	$0,199 \pm 0,103$
	1	$0,145 \pm 0,175$	$0,178 \pm 0,173^*$	$0,254 \pm 0,093^{**}$
<i>D. elliptica</i>	0,0625	$0,029 \pm 0,064$	$0,059 \pm 0,082$	$0,148 \pm 0,125$
	0,125	$0,125 \pm 0,111$	$0,075 \pm 0,106$	$0,219 \pm 0,123$
	0,25	$0,267 \pm 0,125^{***}$	$0,039 \pm 0,051$	$0,257 \pm 0,157^*$
	0,5	$0,230 \pm 0,189^{***}$	$0,019 \pm 0,041$	$0,274 \pm 0,087^*$
	1	$0,289 \pm 0,150^{***}$	$0,049 \pm 0,070$	$0,359 \pm 0,212^{***}$

Médias comparadas com o controle negativo pelo teste de Dunnett: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Abreviações: AA - Alterações aneugênicas, AC - alterações clastogênicas, AD - aderência cromossômica.

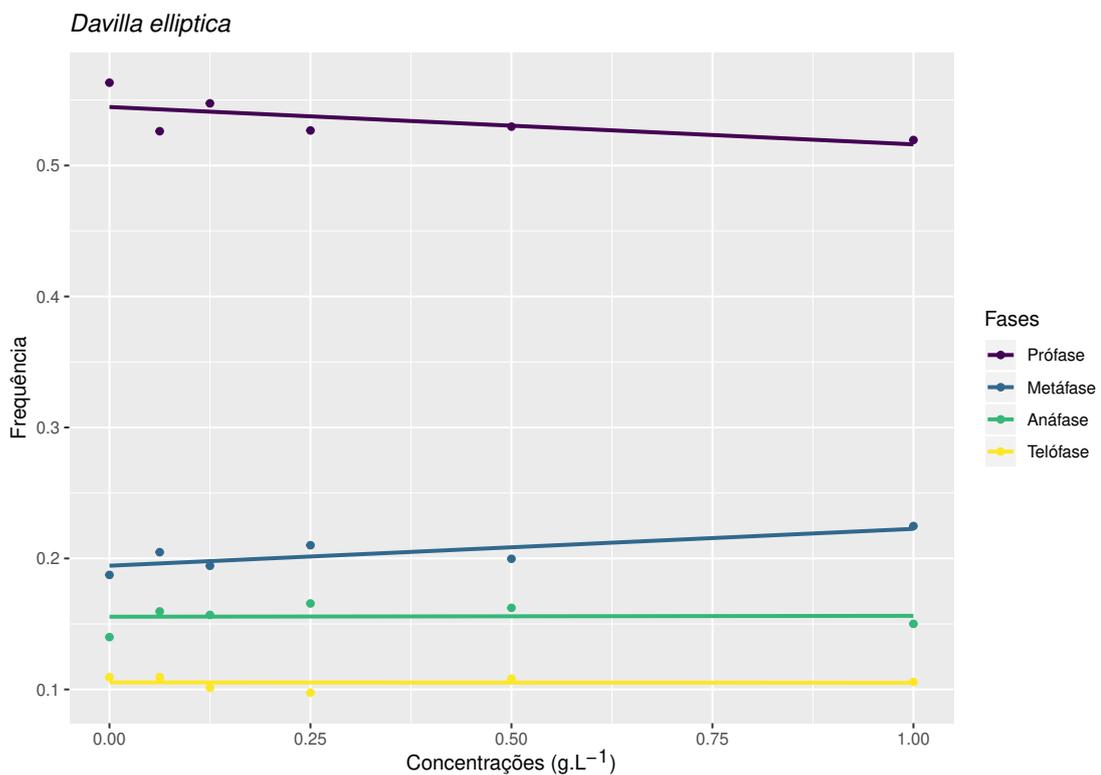
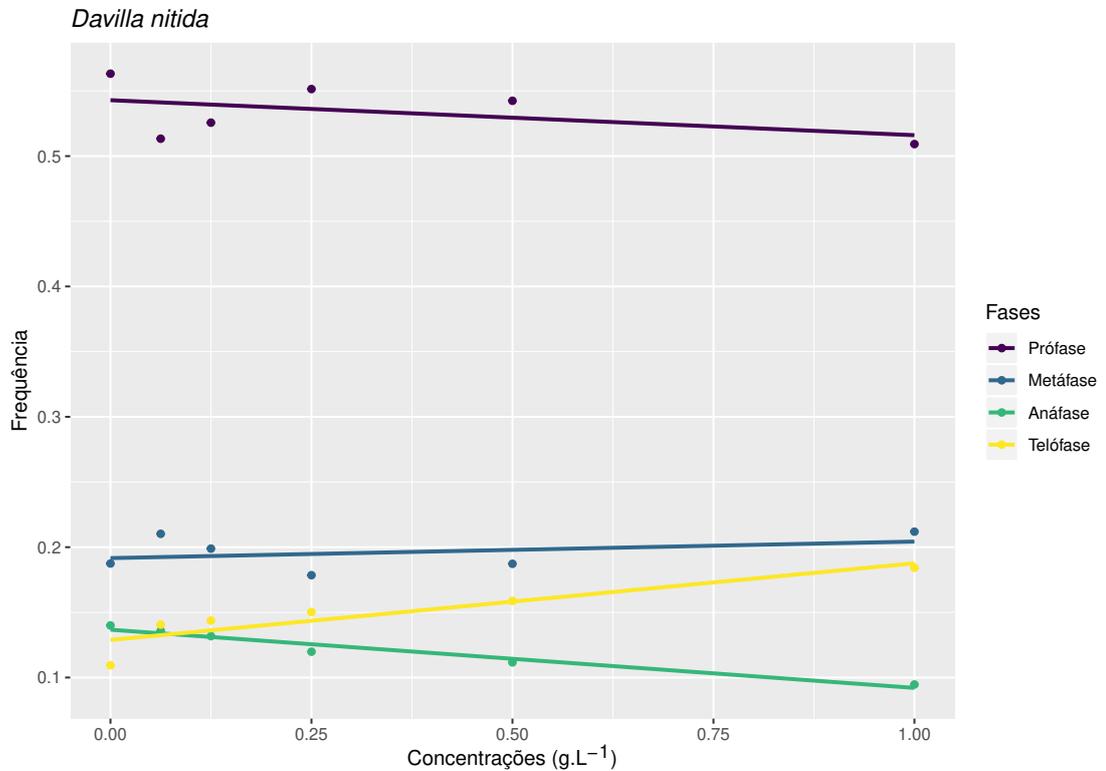
Fonte: Do autor (2019)

Figura 4.3 – Distribuição das alterações cromossômicas de células meristemáticas de *L. sativa* expostas as diferentes concentrações dos extratos das espécies de *Davilla*



Fonte: Do Autor (2019)

Figura 4.4 – Fases do ciclo mitótico de células meristemáticas de *L. sativa* expostas as diferentes concentrações dos extratos das espécies de *Davilla*



Fonte: Do Autor (2019)

5 DISCUSSÃO

5.1 Análises macroscópicas

A avaliação do potencial fitotóxico de um estrato vegetal é realizado através de ensaios de germinação e desenvolvimento inicial da plântula de uma espécie modelo. Por meio do ensaio de germinação é possível obter índices importantes como a razão de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG). O teste de crescimento nos mostra se os extratos testados têm algum efeito sob o crescimento anaeróbico da plântula (TIGRE et al., 2012).

Avaliados os efeitos dos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica* na germinação e desenvolvimento inicial da plântula de sementes de *L. sativa*, observou-se um atraso na germinação de sementes de alface tendo como consequência efeito inibitório da mesma, especialmente nas duas maiores concentrações testadas.

Apesar deste efeito na germinação, as maiores concentrações testadas não apresentaram efeitos significativos no crescimento das radículas em plântulas de *L. sativa*. Vários autores apontam o crescimento da plântula como um parâmetro mais sensível a efeitos fitotóxicos que a germinação (COSTA et al., 2017; VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007). No entanto, estes efeitos inibitórios são mais perceptíveis em alguns casos após um período maior de exposição aos extratos (após 48h) (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010). No presente trabalho a avaliação de crescimento foi realizada após 48h de exposição a fim de comparar os efeitos sobre o crescimento e a divisão mitótica mitótica, uma vez que neste período as células estão em intensa divisão celular.

Tem sido relatado para plantas que o parâmetro macroscópico de crescimento da radícula e plântula como um todo está intimamente relacionado com a frequência de células em mitose, uma vez que, dentre os fatores que levam o alongamento de um órgão vegetal, está o aumento no número de células (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010; COSTA et al., 2017). Como será discutido adiante, o índice mitótico nas células da ponta de raiz também não apresentou alterações significativas após exposição aos extratos. Desse modo os extratos de *D. nitida* e *D. elliptica* testados no presente estudo devem possuir uma ação específica inibindo o processo de germinação sem afetar diretamente o crescimento das radículas.

5.2 Análises microscópicas

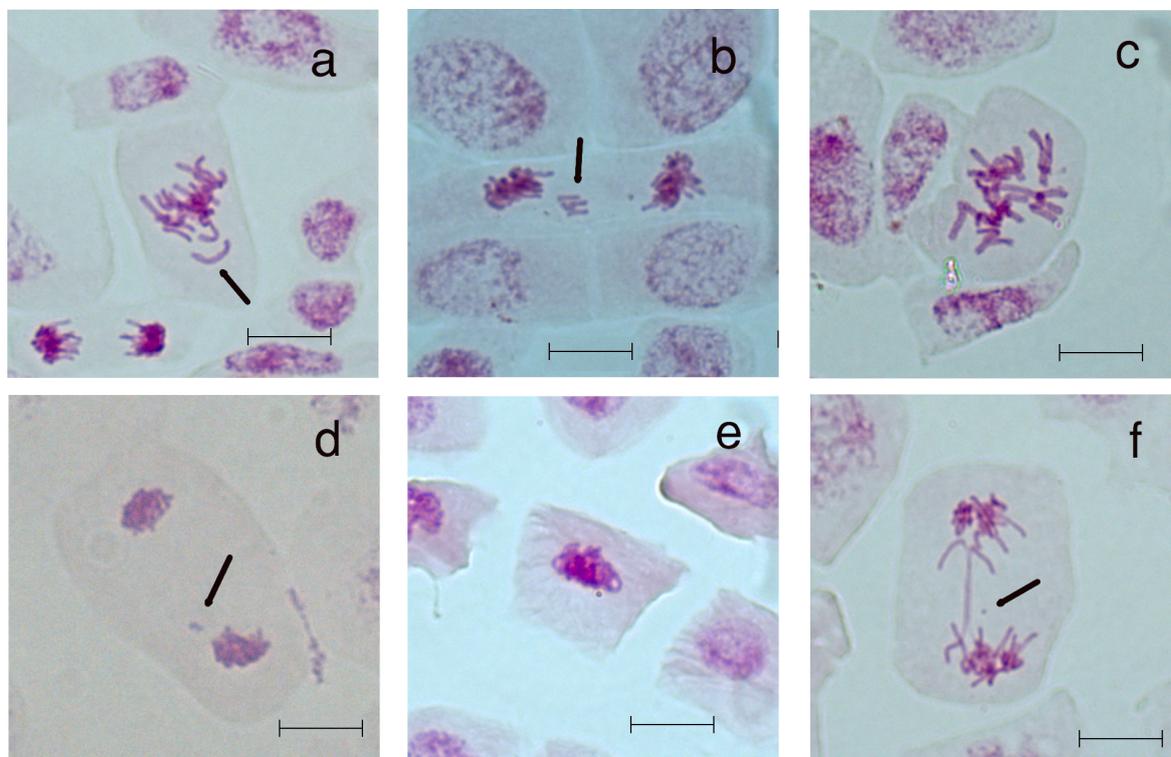
O índice mitótico é considerado um marcador da citotoxicidade de um composto, tanto aumento quanto diminuição do índice mitótico indicam atividade citotóxica do composto testado (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Neste caso nenhum dos extratos alterou significativamente o índice mitótico de *L. sativa*. O que era esperado levando-se em conta o resultado do teste de crescimento, pois as análises microscópicas podem ser relacionadas aos testes macroscópicos como discutido anteriormente.

Além da determinação da citotoxicidade via alterações no IM, a análise microscópica permite determinar a indução de alterações cromossômicas de um dado composto. O conjunto de alterações no ciclo celular e na estrutura dos cromossomos é considerado um marcador citogenético de sua cito-genotoxicidade, além disso é possível observar se esse efeito foi predominantemente clastogênico ou aneugênico, observando os tipos de alterações predominantemente induzidas pelo composto (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Ambos os extratos apresentaram efeito cito-genotóxico significativo por induzir aumento da frequência de alterações no ciclo celular. O extrato de *D. nitida* desde a menor concentração e o extrato de *D. elliptica* a partir da concentração de $0,125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Dentre as alterações induzidas pelos extratos, foram observadas quebras, que assim como pontes cromossômicas (Figura 5.1 f) são alterações clastogênicas, que se formam quando o composto testado age diretamente na estrutura do cromossomo, ocasionando a ruptura de um fragmento do mesmo. Se com quebra de sua extremidade o cromossomo perder suas sequências teloméricas, este então pode perder a estabilidade se ligar a um cromossomo vizinho formando um cromossomo dicêntrico que é puxado para ambos os polos da célula formando uma ponte entre os dois núcleos recém-formados (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Cromossomos não orientados, atrasados, perdidos e c-metáfase (Figura 5.1) são alterações aneugênicas, que provém da não correta polimerização das fibras do fuso mitótico, acarretando um ou mais cromossomos que não são orientados corretamente durante o ciclo celular e podem não ser incorporados pelos núcleos formados, resultado em perda de material genético (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). Freitas et al. (2016) mostraram que este tipo de alteração também pode ter origem na inibição da fosforilação da serina 10 da histona H3 (H3S10ph), o que leva à inativação de regiões pericêntricas, levando a perda de coesão das cromátides irmãs o que também pode acarretar orientação anormal de um ou mais cromossomos durante a divisão celular.

Figura 5.1 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*.



(a) Cromossomo não orientado (seta), (b) cromossomo atrasado (seta), (c) C metáfase, (d) cromossomo perdido (seta), (e) aderência cromossômica e (f) ponte cromossômica com quebra (seta). Barra = 10 μ m.

Fonte: Do Autor (2019)

A aderência cromossômica (Figura 5.1) é uma alteração que ainda não é entendida completamente e que possui hipóteses divergentes quanto a sua origem. Estudando os efeitos da trifluralina, um agroquímico de poderosa ação aneugênica, Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2009) propuseram que essa alteração era advinda da alta contração dos cromossomos em células poliploides, que ocasionava aderência entre os cromossomos. Dessa forma essa seria uma alteração aneugênica. Por outro lado Patil e Bhat (1992) a hipótese de que a aderência tem origem de quebras seguidas da formação de pontes de fibras de cromatina entre cromátides e cromossomos adjacentes. O que tornaria essa uma alteração clastogênica. El-Ghamery; El-Kholy e El-Yousser (2003) aponta, além dessa última hipótese, a possibilidade da ação do composto nas propriedades físico-químicas do DNA, de proteínas ou ambos, o que levaria a formação de complexos com os grupos fosfato do DNA.

A melhor evidência da origem da aderência cromossômica vem de Cuylen et al. (2016), que demonstrou em células humanas que a proteína Ki-67 age como um surfactante biológico

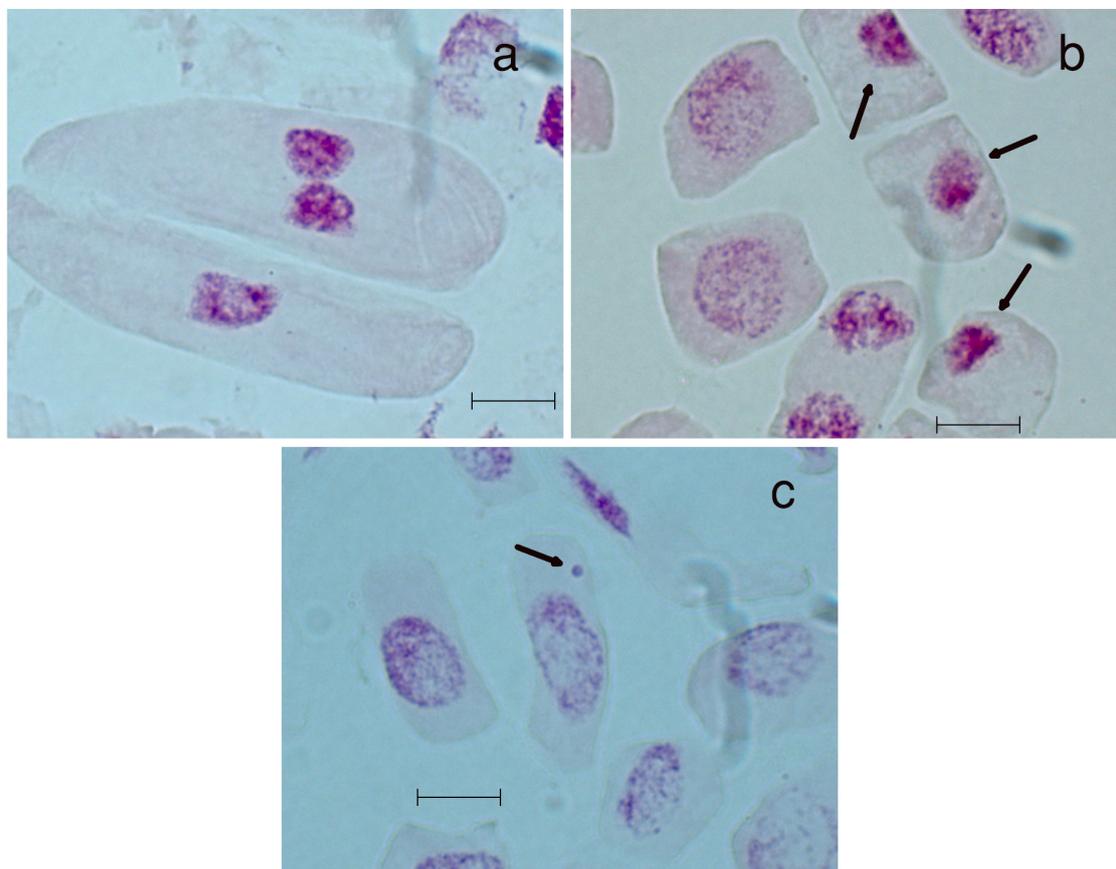
dispersando os cromossomos mitóticos impedindo a aderência, com danos nessa proteína ocorre a aderência. Porém ainda não se sabe se uma proteína similar à Ki-67 atua da mesma forma em células vegetais. Por isso a decisão de não incluir essa alteração nem como de origem clastogênica, nem como aneugênica.

Quando se analisa o total de alterações aneugênicas e clastogênicas (Tabela 4.2) é possível observar que o efeito clastogênico foi mais pronunciado para os extratos *D. nitida*, sendo significativo na maior concentração, enquanto os extratos de *D. elliptica* apresentaram um efeito aneugênico pronunciado, sendo significativo a partir da concentração de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Micronúcleos (Figura 5.2) são uma alteração que pode ter origem tanto de alterações clastogênicas quanto aneugênicas. Eles podem ser formados pela perda de fragmentos cromossômicos acêntricos formados por quebras (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009), ou pela perda de cromossomos inteiros na anáfase/telófase (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Micronúcleos são um marcador de que os mecanismos de reparo da célula não estão sendo capazes de reparar os danos sofridos. Dessa forma é possível dizer que os efeitos causados pelos extratos de *D. nitida* estão sendo mais severos, pois o extrato dessa espécie induziu uma alta frequência de micronúcleos já na menor concentração. O extrato de *D. elliptica* apesar de induzir uma frequência de alterações cromossômicas até mesmo maior nas maiores concentrações, apenas apresentou uma frequência de micronúcleos significativa na maior concentração. Esse fatos indicam uma possível ação mutagênica maior de *D. nitida*.

Células tratadas com o extrato de *D. nitida* apresentaram células binucleadas (Figura 5.2). Isso sugere que este extrato está inibindo a citocinese (KHANNA; SHARMA, 2013). Em coerência com isso, esse extrato também induziu um aumento do número de telófases de forma dose dependente (Figura 4.4). Isso sugere que esse extrato também está apresentando algum efeito aneugênico. A principal classe de compostos identificada nos extratos das duas espécies são flavonoides. Alguns desses compostos já foram identificados como genotóxicos e mutagênicos (SKIBOLA; SMITH, 2000), alguns são conhecidos por seus efeitos aneugênicos como a fisetina e a eupatorina que atuam inibindo de alguma forma a enzima Aurora B kinase, como essa enzima desempenha um papel importante na citocinese, esses compostos também provocam inibição da citocinese (GOLLAPUDI; HASEGAWA; EASTMOND, 2014). Nenhum desses compostos foi identificado nos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*, porém os seus extratos, como já exposto, são ricos em flavonoides que podem estar atuando em sinergia entre si e entre compostos de outras classes para induzir esses efeitos.

Figura 5.2 – Anormalidades observadas em células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos de *D. nitida* e *D. elliptica*.



(a) Célula binucleada, (b) núcleos normais e condensandos (setas), (c) micronúcleo (seta). Barra = 10 μ m.

Fonte: Do Autor (2019)

O extrato de *D. elliptica* induziu um crescente aumento de metáfases (Figura 4.4). Isso provavelmente é consequência de outros efeitos observados para esse extrato, como o potencial de interferir na polimerização dos microtúbulos levando a não correta orientação dos cromossomos durante a metáfase, o que pode ocasionar paralisação da mitose e morte celular (SALMELA et al., 2012). O extrato dessa espécie também foi responsável por causar um aumento significativo de aderência cromossômica a partir da concentração de 0,25 g·L⁻¹ essa é uma alteração considerada grave e que impede o restante da divisão celular, levando a célula à morte (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; KHANNA; SHARMA, 2013). Isso explica o aumento da frequência de metáfases observadas. E corroborando que as células em metáfase afetadas estão entrando em morte celular a frequência de núcleos condensados observados para esse extrato sofreu aumento significativo em todas as concentrações (Tabela 4.1).

A quercetina foi mostrado ser mutagênica em bactérias por meio de diversos testes *in vitro* (CROSS et al., 1996; CZECHOT; KUSZTELAK, 1993; DUFAU et al., 1977). Porém em testes *in vivo* esse potencial não é confirmado. As evidências na literatura são de que a quercetina não apresenta efeitos genotóxicos em ratos (Hoek-van den Hil et al., 2015), não induz alterações cromossômicas em *A. cepa* e ainda reduz a indução de alterações provocadas pela atrazina (MASTRANGELO et al., 2006). Mesmo em testes *in vitro* a metilação da quercetina em diferentes grupos metil, já atenua ou até mesmo inibe completamente a atividade mutagênica desse composto (HARWOOD et al., 2007).

A miricetina também tem sido alvo de investigações acerca de seu potencial genotóxico e mutagênico. Da mesma forma que a quercetina, a literatura reporta evidencia de ação genotóxica e mutagênica da miricetina *in vitro* (MACGREGOR; JURD, 1978), porém assim como com a quercetina, esse potencial não se confirma em testes *in vivo*, assim como seu derivado, a miricitrina (HOBBS et al., 2015).

A avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do extrato de ambas as espécies de *Davilla* e de frações do mesmo, foi conduzida por (BISO et al., 2010), que de forma semelhante ao que foi reportado para os compostos secundários isolados, também se mostrou mutagênico *in vitro* mas em testes *in vivo* esse potencial não foi confirmado. Isso nos faz destacar os bioensaios com vegetais superiores em geral e o organismo modelo *L. sativa* em particular, como um modelo eficiente para a detecção de danos genéticos e celulares causados por extratos vegetais. Além de ser um teste simples e barato, apresenta boa sensibilidade aos efeitos dos compostos testados.

Em conclusão, foi avaliado o potencial fitotóxico, e citogenotóxico de *D. nitida* e *D. elliptica* por meio de bioensaios utilizando o modelo vegetal *L. sativa*. Foi encontrado que o extrato hidroalcoólico de *D. nitida* tem potencial genotóxico, clastogênico, mutagênico e de inibir a citocinese. Por outro lado o extrato de *D. elliptica* mostrou potencial aneugênico e citotóxico expressivo. Como a literatura reporta uma composição química semelhante das duas espécies, essas diferenças no modo de ação do extrato das duas espécies pode ser explicada por possíveis diferenças quantitativas dos compostos entre as duas espécies. Visto a universalidade do material genético, esses resultados nos fazem alertar quanto ao uso indiscriminado de ambas as espécies, pois células humanas podem estar sujeitas a esses efeitos observados em células vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVID, J. A. d. O. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 366–372, nov 2016. ISSN 01476513.
- AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 112, n. 3, p. 470–475, jul 2007. ISSN 03788741.
- AMADI, P. et al. Toxicities of selected medicinal plants and floras of lower phyla. **Alexandria Journal of Medicine**, Elsevier, v. 54, n. 4, p. 587–596, may 2018. ISSN 2090-5068.
- ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 706–710, 2008. ISSN 01476513.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier, v. 73, n. 4, p. 626–631, 2010. ISSN 01476513.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373–382, mar 2014. ISSN 0001-3765.
- ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 1, p. 259–272, 2015.
- ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 65, n. 2, p. 435–443, mar 2017. ISSN 2215-2075.
- ARSECULERATNE, S. N.; GUNATILAKA, A.; PANABOKKE, R. G. Studies on medicinal plants of Sri Lanka: Occurrence of pyrrolizidine alkaloids and hepatotoxic properties in some traditional medicinal herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 4, n. 2, p. 159–177, sep 1981. ISSN 0378-8741.
- BISO, F. I. **Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida* Vahl . e *Davilla elliptica* St . Hil (Dilleniaceae)**. 164 p. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual Paulista, 2008.
- BISO, F. I. et al. Assessment of dna damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (dilleniaceae). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Elsevier, v. 702, n. 1, p. 92–99, sep 2010. ISSN 13835718.
- BOLLE, P. et al. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 43, n. 2, p. 137–141, jan 2004. ISSN 0893-6692.
- BORBOA, L.; TORRE, C. The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytologist**, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), v. 134, n. 3, p. 481–486, nov 1996. ISSN 0028-646X.

BRUNIERA, C.; GROppo, M. Flora da serra do cipó, minas gerais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 2010.

CAMPOS, S. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016. ISSN 1516-0572.

COSTA, A. V. et al. Synthesis of novel glycerol-derived 1,2,3-triazoles and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017. ISSN 14203049.

CROSS, H. J. et al. Effect of quercetin on the genotoxic potential of cisplatin. **International Journal of Cancer**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 66, n. 3, p. 404–408, may 1996. ISSN 00207136.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 535, n. 7611, p. 308–312, 2016. ISSN 0028-0836.

CZECZOT, H.; KUSZTELAK, J. A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. **Acta biochimica Polonica**, v. 40, n. 4, p. 549–54, 1993. ISSN 0001-527X.

DUFAU, M. L. et al. Mutagenic Activity of Quercetin and Related Compounds. **Science**, v. 197, n. August, p. 9–10, 1977.

DUNNETT, C. W. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. **Journal of the American Statistical Association**, v. 50, n. 272, p. 1096–1121, dec 1955. ISSN 0162-1459.

EL-GHAMERY, A.; EL-KHOLY, M.; Abou El-Yousser, M. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 29–41, may 2003. ISSN 13835718.

ERNST, E. Harmless Herbs? A Review of the Recent Literature. **The American Journal of Medicine**, v. 104, n. 2, p. 170–178, feb 1998. ISSN 00029343.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, jul 2007. ISSN 00483575.

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**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009. ISSN 01476513.

FERREIRA, I. C. F. D. S.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 397–400, 1999. ISSN 0951418X.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die- darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler²s Zeitschrift für physiologische Chemie**, Walter de Gruyter, Berlin / New York, v. 135, n. 5-6, p. 203–248, jan 1924. ISSN 0018-4888.

- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985. ISSN 0018-0661.
- FLETCHER, T. D. **QuantPsyc: Quantitative Psychology Tools**. R package, 2012. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=QuantPsyc>>.
- FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier, v. 124, p. 426–434, feb 2016. ISSN 10902414.
- GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 6, p. 40–44, 2011. ISSN 22313354.
- GOLLAPUDI, P.; HASEGAWA, L.; EASTMOND, D. A comparative study of the aneugenic and polyploidy-inducing effects of fisetin and two model Aurora kinase inhibitors. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Elsevier, v. 767, p. 37–43, jun 2014. ISSN 1383-5718.
- GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 37–43, dec 1978. ISSN 0091-6765. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.782737>>.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Elsevier, v. 426, n. 2, p. 107–112, may 1999. ISSN 00275107.
- GURNI, A. A.; KUBITZKI, K. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Pergamon, v. 9, n. 2-3, p. 109–114, nov 1981. ISSN 03051978.
- HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 66–74, feb 2010. ISSN 13695266.
- HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, Pergamon, v. 45, n. 11, p. 2179–2205, nov 2007. ISSN 0278-6915.
- HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier Ltd, v. 83, p. 283–292, 2015. ISSN 18736351.
- Hoek-van den Hil, E. F. et al. Quercetin tests negative for genotoxicity in transcriptome analyses of liver and small intestine of mice. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier Ltd, v. 81, p. 34–39, 2015. ISSN 18736351.
- HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–2095, 2009. ISSN 01476513.

- KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. **Indian J. Pharm. Biol. Res.**, v. 1, n. 3, p. 105–119, 2013.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009. ISSN 13835742.
- LEVAN, A. The Effect of Colchicine on Root Mitosis in *Allium*. **Hereditas**, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), v. 24, n. 4, p. 471–486, may 1938. ISSN 00180661.
- LIMA, C. C.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Dilleniaceae family : an overview of its ethnomedicinal uses , biological and phytochemical profile. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 2, p. 181–204, 2014. ISSN 2278-4136.
- MACGREGOR, J. T.; JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, Elsevier, v. 54, n. 3, p. 297–309, 1978. ISSN 01651161.
- MASTRANGELO, S. et al. Quercetin reduces chromosome aberrations induced by atrazine in the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 47, n. 4, p. 254–259, may 2006. ISSN 0893-6692.
- MATTOCKS, A. R. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 217, n. 5130, p. 723–728, feb 1968. ISSN 0028-0836.
- NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATAÁN, C. A. A. Laboratory bioassays in allelopathy. In: NARWAL, S. S. et al. (Ed.). **Plant bioassays**. Houston: Studium Press, 2008. p. 1–344.
- PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, Water, Air, & Soil Pollution, v. 227, n. 5, p. 156, may 2016. ISSN 0049-6979.
- PATIL, B. C.; BHAT, G. I. A Comparative Study of MH and EMS in the Induction of Chromosomal Aberrations on Lateral Root Meristem in *Clitoria ternatea* L.. **Cytologia**, Japan Mendel Society, International Society of Cytology, v. 57, n. 2, p. 259–264, jun 1992. ISSN 0011-4545.
- PING, K. Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. **Molecules**, Molecular Diversity Preservation International, v. 17, n. 7, p. 7782–7791, jun 2012. ISSN 1420-3049.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.
- REGNER, G. G. et al. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Elsevier, v. 31, n. 1, p. 242–249, jan 2011. ISSN 1382-6689.
- REIGOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 629–646, 2013. ISSN 0102-3306.

- REIS, G. B. dos et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Academic Press, v. 142, p. 110–116, aug 2017. ISSN 01476513.
- RIBEIRO, L. R. et al. Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 68, n. 3, p. 433–438, 2013. ISSN 00063088.
- RODRIGUES, C. M. et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 19, n. 1, p. 17–24, jan 2008. ISSN 09580344.
- RODRIGUES, V.; CARVALHO, D. Levantamento Etnobotânica de Plantas Medicinais no Donimío do Cerrado na Região do Alto Rio Grande- Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102–123, 2001.
- SALMELA, A.-L. et al. The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. **Experimental Cell Research**, Academic Press, v. 318, n. 5, p. 578–592, mar 2012. ISSN 00144827.
- SANTOS, F. E. et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**, mar 2018. ISSN 0944-1344.
- SETH, C. et al. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 711–716, nov 2008. ISSN 01476513.
- SHIN, I. S. et al. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 133, n. 2, p. 696–703, jan 2011. ISSN 0378-8741.
- SILVA, S. et al. Pb low doses induced genotoxicity in *Lactuca sativa* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Elsevier Masson, v. 112, p. 109–116, mar 2017. ISSN 09819428.
- SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, jul 2017. ISSN 00456535.
- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, Pergamon, v. 29, n. 3-4, p. 375–383, aug 2000. ISSN 0891-5849.
- SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *cymbopogon citratus* (DC) stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 82, n. 2, p. 305–311, 2010. ISSN 00013765.
- TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125–132, 2012. ISSN 01476513.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of The Total Environment**, v. 378, n. 1-2, p. 63–66, may 2007. ISSN 00489697.

VIEIRA, P. M. et al. Assessment of the genotoxic, antigenotoxic, and cytotoxic activities of the ethanolic fruit extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) by micronucleus test in mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1409–14, 2010. ISSN 1557-7600.