

Avaliação citotóxica, genotóxica e antiproliferativa de *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae)

Cytotoxic, genotoxic and anti-prophylactic evaluation of *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae)

DOI:10.34117/bjdv7n4-509

Recebimento dos originais: 04/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Weslaine de Almeida Macedo

Doutoranda em Genética e Melhoramento

Instituição: Universidade Estadual de Maringá - UEM

Endereço: Av. Colombo, 5790. CEP 87020-900, Maringá – PR, Brasil.

E-mail: weslaine.af@hotmail.com

Bruna Natália Veloso dos Santos

Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas

Instituição: Universidade Federal de Lavras – UFLA

Endereço: Rua Aqueça Sol, CEP: 37200-900, Lavras - MG, Brasil.

E-mail:brunanataliavs@gmail.com

Vanessa dos Santo de Mello

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

Instituição: Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Endereço: Av. Perimetral Rogério Silva. CEP 78580-000, Alta Floresta – MT, Brasil

E-mail: nessa.demello@hotmail.com

Isane Vera Karsburg

Doutora em Genética e Melhoramento

Instituição: Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Endereço: Av. Perimetral Rogério Silva. CEP 78580-000, Alta Floresta – MT, Brasil

E-mail: isane9@gmail.com

RESUMO

A espécie *Cinchona officinalis* L. pertence a ordem Rubiales e à família Rubiaceae é popularmente conhecida como China, Quina ou Quininha, possui alto valor econômico e medicinal, sendo muito utilizada para tratar doenças como a malária, câibras musculares, inflamações entre outras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a padronização correta das diferentes concentrações de *C. officinalis* utilizando dois bioindicadores como teste in vivo *Allium cepa* e *Pisum sativum*. Os meristemas radiculares de *Allium cepa* e *Pisum sativum* após obterem desenvolvimento de 2 mm das radículas em placa de petri com papel germitest e água destilada e, no caso de *A. cepa* com raízes de 2 cm em copos descartáveis obtidas sob água destilada, foram expostos aos diferentes tratamentos das infusões. Foram utilizadas 3 concentrações (1g, 2g e 3g) da casca de *C. officinalis* para a preparação da infusão, e os controles negativo (água destilada) e positivo (paracetamol 20%). Os meristemas foram coletados após 24, 48, 72 e 96 horas. Após coleta, os meristemas foram lavados em água destilada com 3 trocas consecutivas e fixados em

solução de metanol : ácido acético (3:1) por pelo menos 24 horas sob refrigeração. Para análise do material, os meristemas foram submetidos a técnica de esmagamento com uma gota de Orceina acética 2%. Foram realizadas 15 lâminas de cada tratamento e contabilizadas 300 células por lâmina. A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico sob magnitude de 400x, sob a técnica de varredura. Os biotestes *A. cepa* e *P. sativum* foram sensíveis e eficientes para analisar a toxidez de *C. officinalis*, foi verificado efeito antiproliferativo nos dois bioindicadores, indicando assim a citogenotoxicidade da planta.

Palavras-chave: Citogenotoxicidade, Efeito antiproliferativo, Quina.

ABSTRACT

The species *Cinchona officinalis* L. belongs to the order Rubiales and the family Rubiaceae is popularly known as China, Quina or Quininha, has high economic and medicinal value, being widely used to treat diseases such as malaria, muscle cramps, inflammations, among others. The objective of this work was to evaluate the correct standardization of the different concentrations of *C. officinalis* using two bioindicators as an in vivo test *Allium cepa* and *Pisum sativum*. The root meristems of *Allium cepa* and *Pisum sativum* after obtaining the development of 2 mm of the roots in a petri dish with germitest paper and distilled water and, in the case of *A. cepa* with 2 cm roots in disposable cups obtained under distilled water, were exposed to the different treatments of infusions. Three concentrations (1g, 2g and 3g) of the *C. officinalis* peel were used for the preparation of the infusion, and the negative (distilled water) and positive (paracetamol 20%) controls. Meristems were collected after 24, 48, 72 and 96 hours. After collection, the meristems were washed in distilled water with 3 consecutive changes and fixed in a solution of methanol: acetic acid (3: 1) for at least 24 hours under refrigeration. For analysis of the material, the meristems were submitted to the crushing technique with a drop of 2% Orceina acética. 15 slides of each treatment were performed and 300 cells per slide were counted. The observation of the slides was performed under an optical microscope under 400x magnitude, using the scanning technique. The biotests *A. cepa* and *P. sativum* were sensitive and efficient to analyze the toxicity of *C. officinalis*, an antiproliferative effect was verified in the two bioindicators, thus indicating the cytogenotoxicity of the plant.

Keywords: Cytogenotoxicity, Anti-prophylactic effect, Quina.

1 INTRODUÇÃO

Cinchona officinalis pertence à ordem Rubiales e família Rubiaceae, o gênero *Cinchona* foi descrito por Lineu, onde este a denominou de *Cinchona officinalis*, sendo esta considerada a única existente por alguns anos. (Santos e Pinto, 2012). *C. officinalis* L., conhecida popularmente como quina, é uma árvore/arbusto que pode atingir 16 metros, nativa das florestas úmidas de montanha da [Colômbia](#), [Equador](#), [Peru](#) e [Bolívia](#). O córtex da planta é amplamente utilizado na medicina popular, cuja as propriedades medicinais tem ação no tratamento da malária, indigestão, perda de cabelo e câncer

(Santos e Pinto, 2012; Gurung e De, 2017). Alguns estudos conduzidos indicam a presença de compostos secundário nesta espécie, dentre eles destaca-se o grupo dos compostos alcaloides quinolínicos, principalmente quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina (Fabiano-Tixier et al., 2011; Pradeepa, 2018).

As plantas medicinais são utilizadas em todo o mundo para o tratamento e cura de doenças, no qual a maioria delas não foi suficientemente estudadas, em relação ao seu potencial citotóxico e genotóxico, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste de *Allium cepa* (BAGATINI et al., 2007) e *Pisum sativum* (MELLO et al., 2015).

Tanto o teste de *Allium cepa* quanto o de *Pisum sativum* mostram-se eficientes para analisar efeitos de toxidez seja de metais pesados, plantas medicinais, fatores ambientais, entre outros. E é avaliado através do índice mitótico de células normais e anormais. O Índice Mitótico (IM) é um dado que é expresso em porcentagem, o qual é utilizado para avaliar a taxa de divisão celular. Este tem se mostrado um importante parâmetro para investigar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular (SOBRAL et al., 2013).

E para avaliar este índice é utilizado o teste de *Allium cepa* e *Pisum sativum*, pois o número cromossômico do bioteste está altamente relacionado na obtenção de uma boa análise das células, sendo que o cariótipo de *Allium cepa* consiste em 8 pares de cromossomos (SILVA et al., 2015), e o da ervilha são de 7 pares de cromossomos (CONICELLA & ERRICO, 1990).

Embora as plantas medicinais apresentem vários benefícios à saúde, podem surgir alguns efeitos colaterais decorrentes da toxicidade dos extratos, altas dosagens ou interação com outros medicamentos, sendo necessário obter informações fitoquímicas da planta e métodos que padronizem um sistema de cultivo adequado e em larga escala. Sendo assim estudos que visem à propagação destas espécies e a investigação de seus efeitos genotóxicos, anti-proliferativos e anti-mutagênicos sobre as células são fundamentais (ROCHA, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de citogenotoxicidade de diferentes concentrações de *Cinchona officinalis* por meio de bioindicadores (*Allium cepa* e *Pisum sativum*). Visando fornecer informações para a população e laboratórios fitofarmacos quanto ao uso dessa planta medicinal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

As partes do córtex de *C. officinalis* foram obtidas em comércio local de produtos naturais. Para a preparação do extrato vegetal por infusão (chá), foram estabelecidas três concentrações de *C. officinalis* diluídas em água destilada (dH₂O), 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹, no qual o material permaneceu durante 10 minutos em água fervente, e posteriormente resfriado em temperatura ambiente. Como organismo-teste fez-se o uso de bulbos de cebola (*Allium cepa*) e ervilhas (*Pisum sativum*).

O chá após resfriado, foi alocado em copos descartáveis com bulbos de cebolas (*Allium cepa*), apresentando raízes de 1cm para o teste de citogenotoxicidade. Cada concentração (1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹) obteve quatro bulbos de cebolas, permanecendo em contato com a solução durante 24h, 48h, 72h e 96h, considerada usual, sendo comumente utilizada pela população. Como controle positivo fez-se o uso de bulbos que foram submetidos a uma solução de paracetamol 20% e para o controle negativo em água destilada (dH₂O), totalizando 12 tratamentos. Durante todo o experimento realizou-se trocas diárias dos extratos, no qual foram preparados diariamente e coletado os meristemas radiculares de cada concentração e tempo de exposição.

Para o organismo-teste ervilha (*Pisum sativum*), estas foram mantidas em placas de Petri, forradas com papel filtro e umedecidas com 10 ml de dH₂O até sua germinação. Utilizou-se 60 sementes, que permaneceram acondicionadas em câmara de germinação do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o desenvolvimento de sistema radicular as ervilhas foram submetidas ao extrato em infusão sobre as concentrações e tempo de exposição utilizadas anteriormente de *C. officinalis*. Como tratamento controle positivo fez-se o uso das ervilhas em solução de paracetamol 20% e controle negativo em dH₂O. Trocas diárias dos extratos realizadas e coleta das raízes foram realizadas como citado anteriormente.

Em ambos os organismos-testes os meristemas coletados foram fixados em solução de metanol:ácido (3:1) com três trocas consecutivas e acondicionadas em refrigeração para posterior análise.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Após o pré-tratamento, as raízes foram submetidas a um processo de lavagem de 10 minutos, hidrolisadas em solução de HCl 1N à temperatura ambiente durante 15

minutos, e submetidas a processo de lavagem novamente. Em seguida, as lâminas foram realizadas com a técnica de esmagamento, por meio da retirada do meristema apical com o auxílio de um bisturi dissociada, corada comorceína acética 2%, macerado com bastão de vidro, e coberto por uma lamínula, sendo o excesso de corante foi retirado com papel filtro (Guerra e Souza., 2002).

ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas foram avaliadas utilizando microscópio óptico LEICA sob magnitude de 400x vezes de aumento, pela técnica de varredura. Foram analisadas 300 células por lâmina e confeccionadas 15 lâminas de cada concentração/tempo de exposição, perfazendo 4500 células por tratamento. O potencial citotóxico foi calculado por meio da observação do índice mitótico (IM). O IM foi calculado para cada tratamento utilizando o número de células em divisão / número total de células*100 (Seth et al. 2008). O potencial genotóxico foi estimado pela frequência de anomalias do ciclo mitótico. Para a análise de variância, realizou-se teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizado pelo Programa Estatístico R (Ferreira et al., 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que o extrato *C. officinalis* apresentou efeito citotóxico, havendo uma redução dos valores médios do índice mitótico em todas as concentrações analisadas. Nota-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de tempo de exposição das raízes de cebola em contato com o extrato de *C. officinalis*. Porém nota-se que dentro dos tratamentos houve os que se destacaram dos demais, como no de 24 horas, a concentração de 2 gramas apresentou maior resultado quando comparado com os de 1 e 3 gramas dentro deste tempo. O mesmo ocorreu para o tempo de 48 horas. Já nos tempos de 72 e 96 horas, os resultados que mais se destacaram foi a concentração de 3 gramas. No entanto ambas as concentrações utilizadas apresentaram baixo índice mitótico, o que indica a presença de efeito antiproliferativo nestes tratamentos (Tabela 1).

Os compostos secundários identificados nas cascas de *C. officinalis* no qual, os compostos fenólicos, ácidos orgânicos e saponosídeos são mais estudados. Destacando o grupo dos compostos alcalóides quinolínicos, sendo a principal a quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina (Fabiano-Tixier et al., 2011). Tais compostos podem ter

ocasionado a inibição da divisão celular do meristema apical de *A. cepa*.

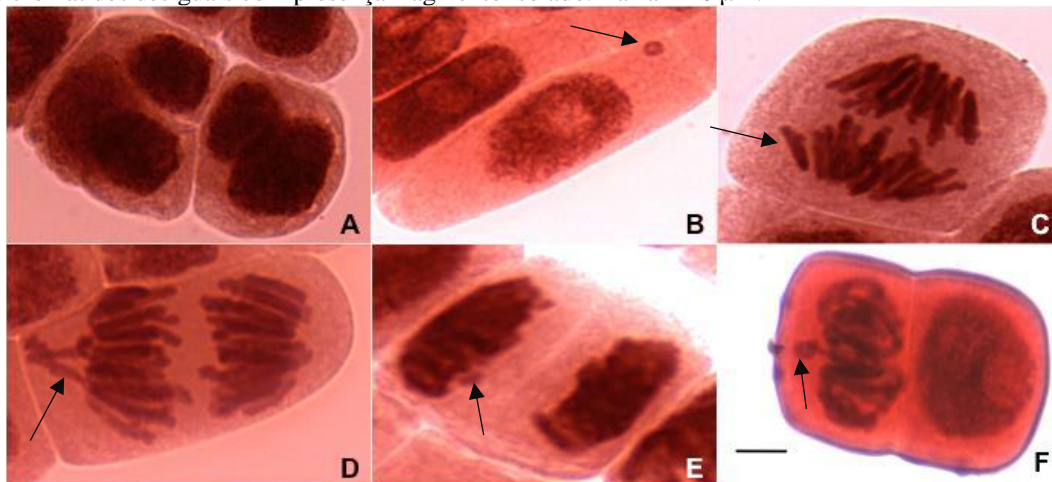
TABELA 1. Análise de células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com diferentes concentrações de *Cinchona officinalis* L.

Tratamentos	Tempos (Horas)	Total de células	NCI	NCDN	NCDA	IM (%)
CN		4500	1240	3260	0	72,44a
CP		4500	2000	860	1640	19,11b
1g	24	4500	4301	142	57	3,15 c
2g		4500	4273	161	66	3,57c
3g		4500	4344	114	42	2,53c
1g	48	4500	4354	88	58	1,95c
2g		4500	4343	119	38	2,64c
3g		4500	4384	67	49	1,48c
1g	72	4500	4330	106	64	2,35c
2g		4500	4336	116	48	2,57c
3g		4500	4070	211	219	4,68c
1g	96	4500	4268	158	74	3,51c
2g		4500	4331	95	74	2,11c
3g		4500	4248	163	89	3,62c
CV (%)						57,97

*(NCI) Números de células em interfase; (NCDN) Número de células em divisão normal e (NCDA) Número de células em divisão anormal. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de scott-knott a nível de 5% de significância.

Neste estudo foram encontradas algumas anormalidades cromossômicas nos chás sob infusão de *C. officinalis* com a utilização de *A. cepa*, tais como: células bi e trinucleadas (Fig. 1 A), presença de micronúcleo em interfase (Fig. 1 B), anáfase com cromátide isolada (Fig. 1 C), cromossomo retardatário (Fig. 1 D) Fig. 1E e Fig 1F.

FIGURA 1. Células do ciclo celular de *Allium cepa* expostas a solução de *Cinchona officinalis* apresentaram alterações em decorrência da toxicidade. A) Células em interfase bi e trinucleadas. B) interfase com presença de micronúcleo. C) Anáfase com cromátide isolada. D) Telófase inicial com cromátides atrasadas. E) Telófase com atraso de fragmento de cromátide. F) Telófase final em estágios de condensação das cromátides desiguais com presença fragmento isolado. Barra = 10 µm.



De acordo com a tabela 2, nos meristemas apicais de ervilhas, o tratamento que obteve maior índice mitótico foi o controle negativo, isso ocorreu devido no controle não haver nenhuma substância tóxica para inibir a divisão das células, pois neste controle foi utilizado apenas a água destilada. Já os tratamentos com as diferentes concentrações de chás de *C. officinalis* obteve baixo índice mitótico, tendo grande quantidade de células em intérfase, apresentando assim efeito antiproliferativo.

O número de células em divisão anormal foi visto nas concentrações de 3 gramas, indicando que quanto maior a concentração utilizada, maior é o efeito do chá, podendo inibir a divisão celular (efeito antiproliferativo) ou divisão celular anormais, apresentando anormalidades cromossômicas.

TABELA 2. Número de células em intérfase e mitose nas raízes emitidas a partir de sementes de ervilha tratadas com diferentes concentrações de *Cinchona officinalis*, mantidos em três diferentes tempos.

Tratamentos	Tempos (Horas)	Total de células	NCI	NCDN	NCDA	IM (%)
CN		4500	904	3596	0	79,90a
CP		4500	1040	2007	967	44,59b
1g	24	4500	4335	63	102	1,39c
2g		4500	4225	160	115	3,56c
3g		4500	4127	103	270	2,28c
1g	48	4500	4179	206	115	4,57c
2g		4500	4168	288	44	6,39c
3g		4500	4228	132	140	2,93c
1g	72	4500	4395	35	70	0,78c
2g		4500	4223	178	99	3,95c
3g		4500	4110	164	226	3,64c
1g	96	4500	4409	15	76	0,33c
2g		4500	4374	62	64	1,38c
3g		4500	4160	217	123	4,82c
CV (%)						87,71

(NCI) Números de células em intérfase; (NCDN) Número de células em divisão normal e (NCDA) Número de células em divisão anormal. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de scott-knott a nível de 5% de significância.

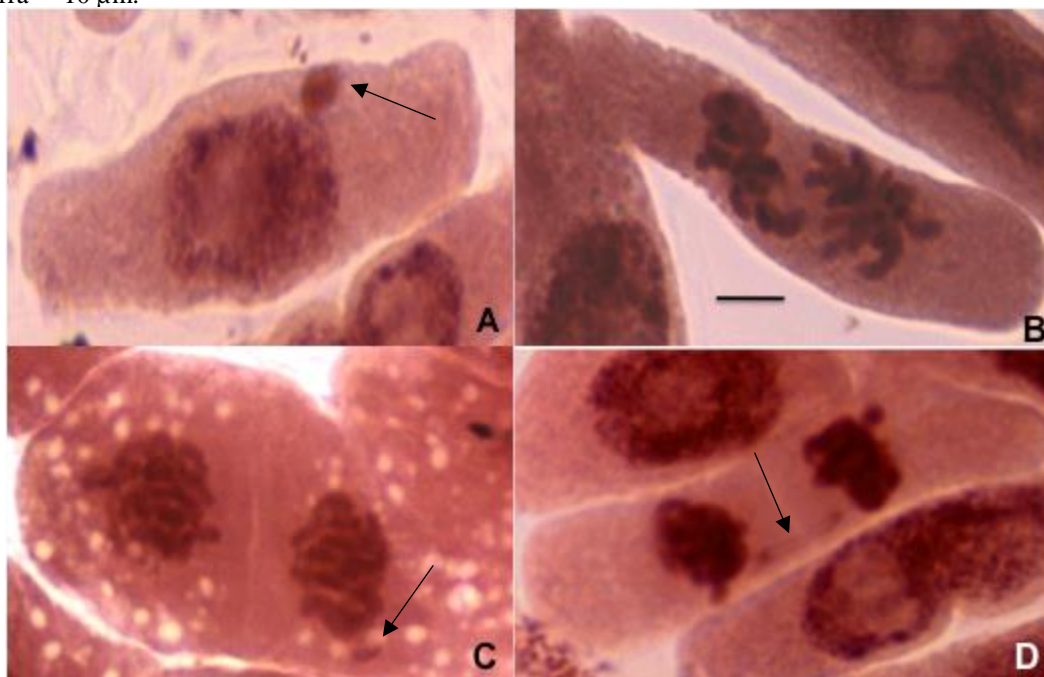
A quinina é o composto que equivale cerca de 80% do total de alcalóides presentes nas cascas de *C. officinalis*. É um potente veneno protoplasmático que atua praticamente em toda célula. Entretanto, é utilizada na medicina como antimalárico e também para o alívio de câimbras musculares noturnas. Este composto quando consumido de maneira inadequada prejudica principalmente as mulheres grávidas, podendo ocasionar o aborto do feto. E as células meristemáticas da raiz da cebola são capazes de trazer resultados se a solução e concentração testada é tóxica ou não para o organismo humano (Marriott, 2012).

Barabanov et al. (2018), mostram em seu estudo a avaliação em percentagem da germinação de semestres de *Pisum sativum* exposta a AgNO₃, nesta análise não houve diferença significativa deste tratamento com o controle. Porém os tratamentos de Ag-PVP, Ag-DDAB, DDAB a uma concentração de 0,05%, ocorreu uma diminuição drástica na percentagem, ocorrendo apenas 30-40% de sementes germinadas observadas. Indicando assim um efeito tóxico dos referidos agentes. Assim nota-se que o estudo de Barabanov et al. (2018), corrobora com o trabalho aqui estudado, pois mostra a eficiência da ervilha sendo importante para estudos sobre toxicidade.

Foram observadas anomalias cromossômicas nos tratamentos estudados exceto no controle positivo, onde a concentração de paracetamol pode ter sido alta e inibido a divisão celular. Encontrou-se anomalias como: Intérfase com micronúcleo (Fig. 2 A), anáfase final com polos diferentes em relação à quantidade de cromátides (Fig. 2 B), telófase final com fragmentos de cromatina isolados (Fig. 2 C) e telófase com ponte (Fig. 2 D).

Segundo Soodan et al. (2017), as aberrações cromossômicas são causadas devido ao efeito sobre o DNA (síntese ou replicação) ou nucleoproteínas, o que pode levar a qualquer efeito de quebra direta nos cromossomos ou segregação anormal de cromossomos.

FIGURA 2. Células meristemáticas de *Pisum sativum* obtidas da exposição de infusão de quina. A) Intérfase com micronúcleo. B) Anáfase final com pólos diferentes em relação a quantidade de cromátides. C) Telófase final com fragmentos de cromatina isolados. D) Telófase com presença de ponte de cromatina. Barra = 10 µm.



Os micronúcleos são consequências da quebra cromossômica e também da disfunção do aparato mitótico, podendo ser formados a partir dos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e que acabam expulsos do núcleo-filho na telófase (Terrazas, 2013). As extremidades dos cromossomos que são quebradas de cromossomas, quando se juntam podem ocasionar a formação de cromossomos em anel, este tipo de anomalias não foi encontrada no presente estudo, no entanto foram analisados diversas células com cromossomos quebrados, formando micronúcleos ou mesmo cromossomos isolados, podendo posteriormente com maior tempo de exposição no chá de *C. officinalis*, poderia ocasionar tal anomalia. (Raghuvanshi e Singh 1976). A formação da ponte, foi uma anomalia encontrada no presente estudo, esta é atribuída quando cromossomos se ligam formando uma ponte ficando de “ponta a ponta” de uma extremidade a outra, sendo a fusão de cromossomos não niveladas, resultando na formação de cromossomas dicêntricos (Tusell et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o chá sob infusão de *Cinchona officinallis* L. apresentou efeito antiproliferativo nos tratamentos estudados, sob os biotestes utilizados. Tanto o teste de *Allium cepa* quanto o de *Pisum sativum* demonstraram eficiência na avaliação da citogenotoxicidade do chá de *C. officinallis*, mostrando que este quando utilizado de maneira inadequada pode trazer efeitos indesejáveis ao organismo.

REFERÊNCIAS

- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, 16, 189-203, 2002.
- BAGATINI, M.D. SILVA, A.C.F.D.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17, 444-7, 2007.
- BARABANOV, P.V.; GERASIMOV, A.V.; BLINOV, A.V.; KRAVTSOV, A.A.; KRAVTSOV, V.A. Influence of nanosilver on the efficiency of *Pisum sativum* crops germination. **Ecotoxicology and environmental safety**, 147, 715-719, 2018.
- CONICELLA, C.; ERRICO, A.A. (1990). Karyotype variations in *Pisum sativum* ect. *abyssinicum*. **Caryologia**, 43, 87-97.
- DOS SANTOS, N.P., PINTO, A.C. “A Mata é sua Farmácia”– A Pesquisa de Plantas Brasileiras para o Combate de Doenças Tropicais no Século XIX. **Revista Virtual de Química**, 4, 162-172, 2012.
- FABIANO-TIXIER, A.S.; ELOMRI, A.; BLANCKAERT, A.; SEGUIN, E.; PETITCOLAS, E.; CHEMAT, F. Rapid and green analytical method for the determination of quinoline alkaloids from *Cinchona succirubra* based on microwave-integrated extraction and leaching (MIEL) prior to high performance liquid chromatography. **International journal of molecular sciences**. 12, 7846-7860, 2011.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes: experimental designs package**. R package version, 1(2), 2013.
- FIRMO, W.D.C.A.; DE MENEZES, V.D.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, Especial, 90-95, 2012.
- GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 426, 183-188. 1999.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. D. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 201, 2002.
- GURUNG, P.; DE, P. Spectrum of biological properties of Cinchona alkaloids: A brief review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** , 6(4), 162-166, 2017.
- MARRIOTT, R. Natural flavourings from green chemistry for foods and beverages. In **Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings**, Woodhead Publishing 260-278, 2012.

MELLO, V.D.S.; MIRANDA, D.P.; DA SILVA, D.D.; MACHADO, D.; DA SILVA, A.B.; DAHMER, N.; KARSBURG, I.V. Efeito Genotóxico de Licor Pirolenhoso de Teca pelo Bioindicador Ervilha. **Estudos**, 41, 141-146, 2015.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 504, 3-16, 2002.

PRADEEPA, R. Pharmacognostical and Phytochemical Studies on Leaves of *Cinchona officinalis*. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 10 (3): 246-250, 2018.

RAGHUVANSHI, S.S.; SINGH, A.K. Effect of gamma rays on growth and Karyokinetic activity in *Trigonella foenum-oraceum* L. **Cytologia** 4, 177 – 186, 1976.

SARITAMA, J.M.R. Rasgos morfológicos de frutos, semillas y embriones de *Cinchona officinalis* L.(RUBIACEAE) en el sur del Ecuador. **Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas**, 36, 27-35, 2017.

SILVA, L.P.; BOSSO, A.A.; CARDOSO, S.C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, 9, 1- 4, (2015).

TERRAZAS, P. M. Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundongos in vitro. 2013. 67 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada) Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP, 2013.

TUSELL, L.; PAMPALONA, J.; SOLER, D.; FRIAS, C.; GENESCA, A. Different outcomes of telomere-dependent anaphase bridges. **Biochemical Society Transactions** 38, 1698 – 1703, 2010.