

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LARISSA SOARES PRIORI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *Lippia
alba* EM LINFÓCITOS HUMANOS, PELO TESTE DE
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS**

BAURU
2015

LARISSA SOARES PRIORI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *Lippia*
alba EM LINFÓCITOS HUMANOS, PELO TESTE DE
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, sob orientação da
Prof^a. Dr^a. Marilanda Ferreira Bellini.

BAURU
2015

P958a

Priori, Larissa Soares

Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica de extratos alcóolicos de lippia alba em linfócitos humanos, pelo teste de micronúcleo em células binucleadas / Larissa Soares Piori. -- 2015.

32f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Erva-cidreira. 2. Lippia alba. 3. Toxicidade. 4. Teste de micronúcleo. 5. Mutação. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.

LARISSA SOARES PRIORI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA
DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *Lippia alba* EM LINFÓCITOS
HUMANOS, PELO TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS
BINUCLEADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Marilanda Ferreira Bellini.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marilanda Ferreira Bellini
Universidade do Sagrado Coração

Bióloga Thaís Bernardes de Queiroz
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Bauru, 4 de dezembro de 2015.

À minha família, por sempre acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram, em alguns momentos, a esperança por seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A minha família, por todo o apoio e amor que foram a mim dedicados através de ensinamentos, conselhos, lições de vida, finanças e colaboração em todos os sentidos. Agradeço a vocês por tudo.

Agradeço aos meus professores e amigos de curso por terem partilhado comigo etapas importantes de aprendizado e por sempre que possível estarem me ajudando.

O meu agradecimento em especial se dá a minha orientadora, professora e amiga, Marilanda Ferreira Bellini, que compartilhou seus conhecimentos, pela confiança, paciência, amizade e incentivos neste ano que estive ao meu lado. Por todos os momentos que necessitei, não medindo esforços, mesmo fora de hora, final de semana, feriado, e-mail, mensagem ou pessoalmente, jamais deixou de me atender e foi fundamental, tanto na minha formação quanto na elaboração desse trabalho, meu muito obrigado!

Agradeço as minhas amigas de trabalho, Thaíssa, Adriane e Mirian, por me ajudarem sempre que precisei, em seus conselhos e ensinamentos, sendo compreensivas, companheiras e sempre pacientes.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade”.

(Walt Disney)

RESUMO

Atualmente, o uso de extratos naturais como fármacos tem tomado grandes proporções, pois concilia seu baixo custo, com sua grande eficiência. A erva-cidreira *Lippia alba*, conhecida também como cidreira-de-arbusto, é uma das plantas que mais se destaca, devido seu grande potencial terapêutico, podendo ser utilizada desde o tratamento de um resfriado, até mesmo como sedativo. Alguns estudos comprovam a eficácia de substâncias presentes no óleo essencial extraído da *Lippia alba*. Também observam-se efeitos ansiolíticos, citostáticos, anticonvulsivantes e antiulcerogênicos atribuídos a esta planta. Neste estudo, foram realizadas as análises de viabilidade celular pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, de mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos etanólico (EE - 100 µg/mL) e metanólico (EM - 100 µg/mL) de *Lippia alba*, respectivamente, associados ou não ao agente indutor de dano metilmetanosulfonato (MMS - 1 µg/mL) por meio de ensaios de micronúcleo em células binucleadas em culturas de linfócitos humanos. Para isto, foram coletadas amostras de sangue periférico de 2 indivíduos adultos, saudáveis, do sexo masculino. A viabilidade celular foi > 99% em ambos tratamentos, indicando que os extratos de *Lippia alba* não interferem na viabilidade. Já as análises de micronúcleos indicam que os extratos não são mutagênicos, pois o número de células com micronúcleos não se diferenciou estatisticamente do controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO - 30µL). Os resultados para antimutagenicidade também não foram significativos. Desta forma, sugere-se que os extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba* não induzem dano ao material genético, e também não protegem o material genético perante danos induzidos por MMS.

Palavras-chaves: Erva-cidreira. *Lippia alba*. Teste do micronúcleo. Toxicidade. Mutação.

ABSTRACT

Currently, the use of natural extracts as drugs is taking major because reconciles its low cost, with its great efficiency. Lemon balm *Lippia alba*, also known as lemon-de-bush, is a plant that stands out because of its great therapeutic potential and can be used from treating a cold, even as a sedative. Some studies support the efficacy of ingredients of the essential oil extracted from *Lippia alba*. Also are observed anxiolytic effects, cytostatics, anticonvulsants and antiulcerogenics assigned to this plant. In this study, cell viability analysis was performed by Trypan Blue Exclusion Method, mutagenic and antimutagenic effects of ethanol (EE - 100 mg / mL) and methanol (MS - 100 mg / mL) extracts of *Lippia alba*, respectively, associated or not the damage-inducing agent metilmetanosulfonato (MMS - 1 / ml) by micronucleous assays in binucleated cells (human lymphocyte cultures). For this, blood samples of 2 adults males, healthy individuals were collected. Cell viability was > 99% in both treatments, indicating that *Lippia alba* extracts did not affect viability. As for the analysis of micronuclei indicates that the extracts are not mutagenic, since the number of cells with micronuclei did not differ statistically from the negative control (dimethyl sulfoxide - DMSO - 30 μ L). The results for antimutagenicity were not significant. Thus, it is suggested that the ethanol and methanol extracts of *Lippia alba* do not induce damage to the genetic material, nor protect the genetic material against damage induced by MMS.

Keywords: Lemongrass. *Lippia alba*. Micronucleous Test. Toxicity. Mutation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 MEDICINA POPULAR E FITOTERAPIA	9
1.2 ERVA-CIDREIRA	10
1.2.1 <i>Lippia alba</i>	11
1.3 MUTAÇÕES E MICRONÚCLEOS.....	13
1.4 GENÉTICAS TOXICOLÓGICA	14
2. JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	16
4.2 MATERIAL BOTÂNICO	16
4.3 CULTURA CELULAR	16
4.4 AGENTE INDUTOR DE DANOS AO DNA.....	17
4.5 TRATAMENTOS	17
4.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	18
4.7 TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS.....	18
4.8 ÍNDICE MITÓTICO	18
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	21
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEDICINA POPULAR E FITOTERAPIA

No Brasil, as plantas possuem grande importância na medicina popular, desde muito antes da colonização do país, onde os índios já utilizavam estas ervas para fins alimentares e medicinais, preservados até hoje por grupos indígenas habitantes da Amazônia. (MILLIKEN, 1997; MILLIKEN; ALBERT, 1997). Esta região possui ampla diversidade de espécies, sendo considerada como a maior reserva de produtos naturais com ação medicinal do mundo. (YUNES; CALIXTO, 2001; DI STASI, 2002).

Em 1940, Mahatma Gandhi preconizou a elaboração de um manual sobre o emprego de plantas medicinais em substituição às drogas que os laboratórios produziam. Desde então, a busca e pesquisa pelas propriedades medicinais das plantas cresceu exponencialmente. (GRAIG; BARBARA, 1984). A utilização das plantas medicinais pela população sempre foi vista como uma prática aliada ao tratamento de patologias, buscando uma forma de substituição dos medicamentos sintéticos pelos naturais, devido à relação custo/benefício. No entanto, o uso contínuo de alguns antibióticos sintéticos no tratamento de doenças, acarretou o aumento da resistência microbiana no organismo, entretanto, as plantas medicinais possuem propriedades antimicrobianas fazendo com que haja a redução dos efeitos colaterais agressivos causados pelas drogas sintéticas. (MATOS, 1998).

O baixo custo, fácil acesso e a história cultural das plantas torna seu emprego medicinal recomendável, de maneira especial no atendimento às comunidades onde a assistência à saúde tem se mostrado escassa. Neste sentido, as plantas medicinais aparecem como fonte inexplorada de compostos com propriedades terapêuticas, despertando novos interesses de pesquisa científica, e assumindo crescente importância como recurso terapêutico útil nos programas de saúde primária. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A natureza é o maior laboratório de substâncias medicinais, e sem ela a medicina convencional não existiria na verdade. (GRAIG; BARBARA, 1984)

Além das plantas medicinais, surgem também os fitoterápicos, uma segunda alternativa à terapia medicamentosa, que podem ser definidas como: Todo o medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se, exclusivamente,

matérias-primas ativas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. (BRASIL, PORTARIA n.6, DE 31 DE JANEIRO DE 1995; VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2000).

Considerado um tratamento seguro, os riscos e eficácias de qualquer medicamento fitoterápico é testado e analisado através das pesquisas etnofarmacológicas incorporadas a análises científicas e trabalhos clínicos. Apenas depois do conhecimento completo de todas as interações possíveis que esse medicamento está sujeito a sofrer, sendo possível atestar seu uso de forma segura, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite sua comercialização. (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

A medicina popular utiliza-se das diversas partes das plantas, como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes, de acordo com o vegetal em estudo. Essas estruturas, na maioria das vezes, não podem ser utilizadas da mesma forma (infusão, extrato, cápsula), pois perdem sua eficácia. (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Há também diferentes formas de preparação destas plantas, sendo o chá a mais utilizada, preparado por meio da decocção ou infusão. No primeiro processo, a planta a ser utilizada é fervida junto à água; já no segundo, a água é fervida sozinha e depois colocada sobre a planta, quando são liberados os seus princípios terapêuticos. (LAINETTI; 1998)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) já reconhece, na atualidade, a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é baixo. No Brasil, o estímulo ao uso da fitoterapia teve início no lançamento do “Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico” em 2008, criado com o intuito de incorporar aos serviços públicos de saúde e garantir à população o acesso as plantas medicinais e fitoterápicos seguros e eficazes, ampliando as opções terapêuticas e fortalecendo o complexo produtivo e o uso sustentável da biodiversidade. (Portal da Saúde, 2014).

1.2 ERVA-CIDREIRA

Conhecida popularmente como cidreira ou melissa, a erva-cidreira pode ser utilizada das mais variadas formas, como chás, macerada em compressa, banhos, entre outros. Apresenta aroma característico semelhante ao odor de limão, devido as substâncias contidas em seu óleo vegetal, quando exposta a fatores externos

como: período de floração, idade da planta, condições ambientais, geográficas e climáticas podem sofrer variações qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial da planta, (AGUIAR et al., 2008) podendo ser alterado de acordo com o local selecionado para destilação do óleo. (LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011; REIS et al., 2009).

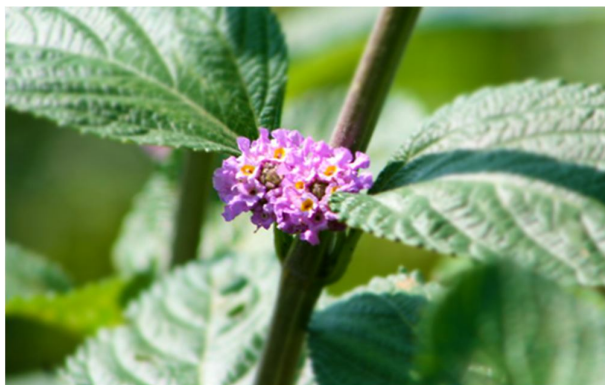
Possui propriedade antiespasmódica, antipirética, anti-inflamatória, diaforética, analgésica e sedativa. (JULIO et al., 2003; BARBOSA-FILHO et al., 2006). Em outros países, na medicina popular, são utilizadas as estruturas da erva-cidreira, como folhas e flores, para extração de seus princípios ativos e cozimento sendo usadas para o tratamento de resfriados, bronquites, tosses, asma, febre, diarreia, problemas hepáticos e sífilis. (BARBOSA et al., 2006; MANICA-CATTANI et al., 2009). A planta é empregada também para controle de patógenos, na indústria de cosméticos, e como aditivo em comidas. (ADINEE; PIRI; KARAMI, 2008; LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011).

De acordo com a lista publicada pela central de medicamentos, trata-se de uma das espécies medicinais mais utilizadas pela população brasileira. (SANTOS; INNECCO, 2004). Dentre as espécies de erva-cidreira utilizadas na medicina popular, destacaremos neste trabalho a espécie *Lippia alba*.

1.2.1 *Lippia alba*

Originária da América do Sul, planta brasileira pertencente à família Verbenaceae e popularmente denominada de alecrim falsa ou melissa. Pode atingir 2 metros de altura, mas, em geral, não ultrapassa 1 metro. Apresenta ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços, portando folhas opostas, elípticas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo. As flores estão reunidas em inflorescência capituliformes de eixo curto, que apresentam dois diferentes tamanhos. (LORENZI; MATOS, 2008). (FIGURA 1)

Figura 1 - *Lippia Alba*.



Fonte: Zulmiro A. Fonseca (2003).

A prática mais comum de seu consumo se dá sob a forma de infusão de suas folhas (chás), maceradas, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos, por conta de suas propriedades farmacológicas, dos constituintes ativos, dentre eles, o óleo essencial. (LORENZI; 2008) Apresentando função analgésica, antiespasmódica, calmante, relaxante muscular, entre outras. (DINIZ; RIBEIRO, 2008)

Os princípios ativos das plantas medicinais são as substâncias que a mesma sintetiza e armazena durante seu crescimento (ATTI-SERAFINI et al.; 2002). Distribuem-se de maneira disforme no vegetal, concentrando-se preferencialmente nas suas folhas, flores e raízes, sendo que essa concentração varia de acordo com o ciclo de vida, habitat, colheita e preparação da planta. (TESKE; TRENTINI, 2001).

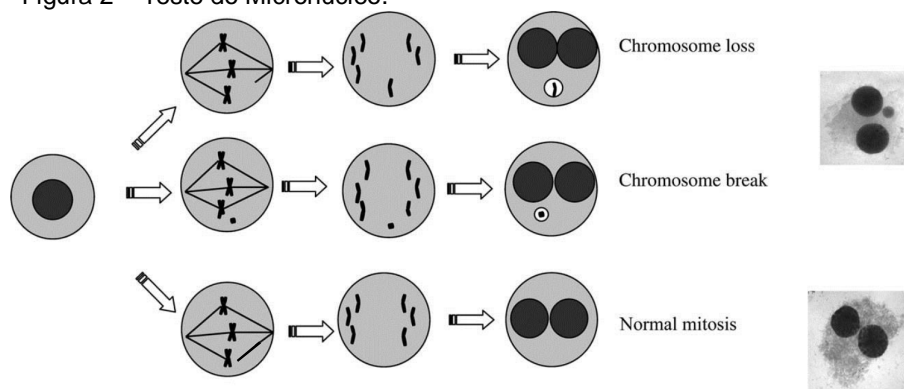
Em 1991 Cáceres e colaboradores citaram, pela primeira vez, a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas de *Lippia alba* frente à *Staphylococcus aureus*. Dez anos mais tarde, a ação antimicrobiana de soluções hidrolcoólicas a 80% da mesma espécie foi verificada frente a este microrganismo. (SOARES, 2001; FILHO, SENA et al. 2006). Também foi confirmado por Pessini et al. a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos da raiz de *L. alba* frente a *S. aureus*, extratos brutos, óleos essenciais e mel do néctar das flores mostraram atividade antibiótica para diferentes microrganismos (SANTOS, 1996; ALEA et al., 1997; OLIVEIRA, 2000; RAO et al., 2000; HOLETZ et al., 2002; PESSINI et al., 2003; BARBOSA, 2003). Mais recentemente, Duarte et al. (2005), referiram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *L. alba* sobre *Candida albicans*.

1.3 MUTAÇÕES E MICRONÚCLEOS

Qualquer alteração no DNA, podendo ser transmitida aos descendentes em modificações atingidas em células germinativas, gerando indivíduos com uma ou mais características genéticas diferentes, ou atingindo células somáticas, e desta forma não sendo transmitida à progênie, é definida como um processo de mutação. (BURNS; BOTTINO, 1991)

As mutações podem ser observadas através da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma, que se manifestam em células por divisão, como resultado de quebras cromossômicas, pode ser encontrada como: fragmentos acêntricos, pontes nucleoplasmática e o broto nuclear (MILLER, 1973; FENECH, 2011). Um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo, podendo assim constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (COSTA et al, 2000; FENECH, 1997). Para ser considerado como um micronúcleo, sua massa nuclear deve possuir o diâmetro entre 1/16 até, no máximo 1/3 dos núcleos principais (ou entre 1/256 a 1/9 da área de um dos núcleos principais). (FENECH, 2000). (FIGURA 2).

Figura 2 – Teste do Micronúcleo.



Fonte: Modificado de Andreassi et al. (2007, p.2196).

O ensaio do micronúcleo é um dos testes mais utilizados para detecção de agentes clastogênicos (agentes que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (agentes que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994). Sua sensibilidade e precisão, juntamente com a detecção de perda cromossômica, caracterizam as

principais vantagens do teste de micronúcleos dentro da genética toxicológica. (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH; 2003). Essas alterações ou mutações genéticas podem ocorrer em vários níveis, por exemplo: em um único nucleotídeo, em um pequeno segmento de DNA, em genes inteiros, na estrutura dos cromossomos ou no cromossomo todo. (BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003).

1.4 GENÉTICAS TOXICOLÓGICA

A toxicidade de uma substância pode ser considerada como a sua capacidade de ser prejudicial, causando danos ao organismo. Já o conceito sobre o que é tóxico está relacionado com a detecção, exposição, composição química e ação biológica de substâncias potencialmente nocivas. (BARROS; DAVINO, 2008). A genética toxicológica detecta e entende a ação das genotoxinas no organismo, sendo estas substâncias que agem especificamente nos ácidos nucleicos e dna. (VOGEL, 1989).

A maioria das plantas medicinais utilizadas por automedicação não têm o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VIEGA-JUNIOR, 2008). Desse modo, a grande preocupação com o uso desses medicamentos advém do fato de que seu uso indiscriminado, associado diretamente ao conceito de inocuidade, pode ser potencialmente tóxico ao organismo. (FONSECA; PEREIRA, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Wong e colaboradores (2013) realizaram um estudo no centro de assistência toxicológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), verificando que a presença de alcalóides e proteínas tóxicas de algumas espécies medicinais foram as principais causas de intoxicações decorrentes da manipulação e utilização incorretas dessas plantas, sem orientação médica. Nesse contexto, é importante compreender o potencial mutagênico da *Lippia alba*, como uma via para determinar o risco de prejuízo genético nas pessoas que a consomem desordenadamente, de forma que a população possa fazer uso da planta sem comprometer a sua saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades mutagênica e antimutagênica de extratos alcóolicos de *Lippia alba*, *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a indução de micronúcleos em células binucleadas, dos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba*, em cultura de linfócitos humanos;

b) Analisar o efeito antimutagênico dos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba*, perante a indução de danos por metilmetanosulfonato, em cultura de linfócitos humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho é um subprojeto do projeto “Anti/Clastogenicidade da espécie de erva-cidreira: *Lippia Alba*”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CEP/USC No. 382.227). Foram coletadas amostras de sangue de indivíduos adultos e saudáveis, do sexo masculino, que aceitaram participar do projeto, após esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), elaborado de acordo com a Resolução 466/12, onde serão resguardados os dados sobre sigilo e a apresentação de resultados será apenas em meios de divulgação científica e codificados.

4.2 MATERIAL BOTÂNICO

Os extratos metanólico e etanólico de *Lippia alba* foram obtidos de acordo com Zelnick et. al. (1977), pela bióloga Thais Bernardes de Queiroz, no Laboratório de Controle Físico-químico de Medicamentos (USC), sob supervisão do Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves.

4.3 CULTURA CELULAR

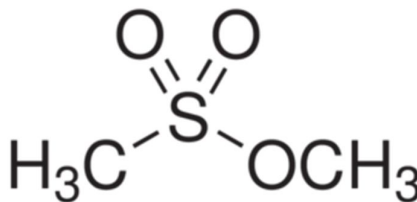
A cultura de linfócitos foi obtida a partir de sangue total de 2 voluntários adultos e saudáveis, do sexo masculino, na faixa etária de 20 a 35 anos, sem histórico de doenças recentes, não-fumantes, sem exposição recente a radiações ou medicamentos, cujos experimentos foram realizados entre 2013 e 2014. Foram coletados 3mL de sangue periférico em seringa descartável heparinizada. Após a coleta, a seringa foi deixada em posição vertical, evitando o calor e agitação, a fim de prevenir hemólise. Em um frasco de cultura contendo 5 mL de meio RPMI 1640 com Hepes (Cultilab, Brasil), 20% de soro fetal bovino (Inativado, estéril, isento de mycoplasma – Cultilab, Brasil), 2% de fitohemaglutinina A (Gibco, USA, Cat.# 10576-015), e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, USA, Cat.# 15140-148), foram adicionados aproximadamente 0,5 mL de sangue e incubado a 37°C em estufa (502

FANEM – São Paulo – Brasil), por 6 horas. Após esse período, os tratamentos de mutagenicidade e antimutagenicidade foram realizados. Ao término do experimento, foi reservado 10µl da suspensão celular para a análise da viabilidade celular.

4.4 AGENTE INDUTOR DE DANOS AO DNA

Para a indução de danos ao DNA foi utilizado o agente alquilante, de ação direta Metilmetanosulfonato – MMS (CAS: 66-27-3, SIGMA- ALDRICH, USA) (FIGURA 2), que atua diretamente no material genético, causando aductos de DNA, pela adição de grupos metil, preferencialmente em 7-guanina, mas também em 3-adenina e 3-guanina, sem necessidade de metabolização prévia. (SIGMA-ALDRICH, 2013). A solução estoque foi preparada em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,4, estéril. A concentração final em cultura, estabelecida em testes pilotos, foi 1µg/mL.

Figura 2 – Estrutura Molecular de Metilmetanosulfonato.
Fórmula Linear $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$.



Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

4.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram realizados simultaneamente por 72h.

- Controle Negativo (30 µL de DMSO);
- Controle Positivo - Agente Indutor de Dano (1 µg/mL de MMS);
- Extrato etanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL);
- Extrato metanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL);
- Extrato etanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL) + MMS (1 µg/mL);
- Extrato metanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL) + MMS (1 µg/mL);

4.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (Gibco, USA, Cat.# 15250-061), um corante que penetra no interior das células que perderam a integridade da membrana plasmática. (MASCOTTI; MCCULLOUGH; BURGER, 2000). Dez microlitros da suspensão celular foram coletados e adicionamos a 90 μ L de meio RPMI 1640 com Hepes. Posteriormente, foram coletados 10 μ L desta suspensão celular, juntamente com 10 μ L do corante Azul de Trypan, que foram dispensados em Câmara Neubauer (Labor Optik). A contagem das células coradas e não coradas em azul foi realizada e o cálculo baseado no percentual da divisão do número de células não-coradas (vivas) pelo número total de células contadas (coradas e não-coradas) (CURY, 2005). Sendo que o critério para considerar válido o experimento é uma viabilidade maior que 50%.

4.7 TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS

Após 44 horas de incubação, adicionou-se 100 μ L de Citocalasina-B (6 μ g de CtB/mL da cultura – REF. C6762, SIGMA-ALDRICH, BRASIL) em cada frasco de cultura, e foi conservado em estufa por mais 28 horas. Os procedimentos para a colheita e a fixação foram baseados em Salvadori, Ribeiro e Natarajan (1993). A análise foi realizada em microscópio de luz, contabilizando a quantidade células binucleadas em cada tratamento / voluntário, analisando a presença ou ausência de micronúcleo. Os critérios utilizados para a análise dos micronúcleos em células binucleadas foram estabelecidos por Fenech (2000) e Bückner; Carvalho; Alves-Gomes (2006).

4.8 ÍNDICE MITÓTICO

Para análise do índice mitótico (IM), foram contadas 1000 células em microscópio de luz com aumento de 400x, diferenciando células mononucleadas de binucleadas. O IM será obtido através da equação $IM = b/T \times 100$.

Sendo que:

b = número de células binucleadas
 T = número total de células (mononucleadas + binucleadas)

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística descritiva dos dados e as comparações entre os grupos serão feitas por *t-Student*, seguindo critérios de normalidade.

5 RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, pode-se verificar que todos os tratamentos foram viáveis (> 99%). (Tabela 1).

Tabela 1- Avaliação de viabilidade celular dos extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L em linfócitos humanos, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan.

Tratamentos	Viabilidade Celular
	Média \pm DP
Controle Negativo (DMSO)	100,00 \pm 0,004 ^{ns}
Controle Positivo (MMS)	99,99 \pm 0,010 ^{ns}
Clastogenicidade	
EE <i>L. alba</i>	99,99 \pm 0,006 ^{ns}
EM <i>L. alba</i>	99,99 \pm 0,008 ^{ns}
Anticlastogenicidade	
EE <i>L. alba</i>	99,99 \pm 0,003 ^{ns}
EM <i>L. alba</i>	100,00 \pm 0,000 ^{ns}

DMSO: dimetilsulfóxido (30 μ L); MMS: Metilmetanosulfonato (1 μ g/mL); EM: extrato metanólico (100 μ g/ mL); EE: extrato etanólico (100 μ g/ mL); ^{ns} não significativo Teste *t- Student* ($p > 0,05$) ; DP desvio padrão.

O índice mitótico teve amplitude de 13,5 \pm 3,0 no controle positivo a 40,8 \pm 10,6 no tratamento com EM, indicando que os tratamentos com os extratos podem ter

induzido a divisão celular, entretanto esses dados não foram estatisticamente significativos (Tabela 2).

A análise dos dados de micronúcleo em células binucleadas, indica que os extratos alcoólicos de *Lippia alba*, não apresentam atividade mutagênica em linfócitos humanos e também não são antimutagênicos, ou seja, o uso diário de *Lippia alba* não danifica o material genético da célula, porém também não o protege, quando associados ao MMS. Apesar da diferença nos valores, esses dados não foram estatisticamente significativos, provavelmente devido as diferenças no número de células binucleadas contabilizadas.

Tabela 2 - Avaliação de atividade mutagênica e antimutagênica de extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* pelo teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados

Tratamentos		Índice Mitótico (%)	Células Binucleadas	Células Binucleadas com Micronúcleo	
		Média ± DP	Total	Total	Média ± DP
Controle	Negativo				
(DMSO)		14,0 ± 1,2 ^{ns}	2095	14	7,0 ± 5,0 ^{ns}
Controle Positivo (MMS)		13,5 ± 3,0 ^{ns}	2778	27	13,5 ± 5,0 ^{ns}
Clastogenicidade					
EE <i>L. alba</i>		24,4 ± 2,6 ^{ns}	1802	750	375,0 ± 27,5 ^{ns}
EM <i>L. alba</i>		40,8 ± 10,6 ^{ns}	2595	647	323,5 ± 146,5 ^{ns}
Anticlastogenicidade					
EE <i>L. alba</i> + MMS		40,2 ± 11,6 ^{ns}	2337	1089	544,0 ± 327,5 ^{ns}
EM <i>L. alba</i> + MMS		31,6 ± 5,6 ^{ns}	4181	1646	823,0 ± 213,0 ^{ns}

DMSO dimetilsulfóxido; MMS metilmetanosulfonato; EE= extrato etanólico; EM= extrato metanólico; Símbolo de média ± DP desvio padrão; ns= não significativo; ^{ns} Teste t-Student pareado, unicaudal, não apresentam diferença estatisticamente significativa (p>0,05). Fonte: elaborado pelas autoras.

6 DISCUSSÃO

Aguiar e colaboradores (2008), verificou a atividade antimicrobiana de *Lippia alba in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et., 1966). Os extratos acetônico, etanólico, metanólico e aquoso de raiz, caule e folhas foram testados frente aos microrganismos: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; *Monilia sitophila* UFPEDA 2083 e *Candida albicans* UFPEDA 1007. Os extratos etanólicos e metanólicos das folhas de *L. alba* apresentaram atividade frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* e *M. sitophila*. Já os extratos acetônico e etanólico das raízes de *L. alba* foram ativos frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. albicans* e *M. sitophila*; extratos acetônico frente a *C. albicans* e extratos etanólico frente a *M. sitophila*. Entretanto, nenhum extrato mostrou atividade frente a *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*. Esses efeitos antimicrobianos devem-se a capacidade dos extratos inibirem o desenvolvimento das bactérias. Sugere-se que danos não foram observados em linfócitos humanos, como em bactérias, visto que são células eucariontes, as quais apresentam maior proteção ao material genético, o que não é observado em células procariontes.

Costa e colaboradores (2004), estudaram as atividades citotóxicas de extratos brutos de raiz, caule e folhas de *Lippia alba*, em duas linhagens celulares; NCI-H292 (células mucoepidermóides de carcinoma de pulmão humano) e HEP-2 (Human Epidermoide Cancer Cells, tumor primário de laringe humana), mostraram atividades citotóxicas significativas. As células NCI-H292, foram mais sensíveis ao extrato clorofórmico da raiz, mostrando atividades citotóxicas significativas com valores da CI50 iguais a 4,64, 16,30, 11,43, 19,74 e 25,12 µg/mL, respectivamente. Enquanto as células HEP-2, foram mais sensíveis ao extrato etanólico das folhas, mostraram atividades citotóxicas significativas com valores da CI50 iguais a 11,51, 8,17 e 14,44 µg/mL. Comparando esses dados com os encontrados no presente trabalho, podemos inferir que os extratos de *L. alba* apresentam atividades citotóxicas em células tumorais, entretanto essa atividade não é verificada em células normais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo preliminar, a análise dos resultados sugere que os extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba* não interferem na viabilidade, bem como não induzem micronúcleos em linfócitos humanos, em contrapartida, quando associados ao metilmetanosulfonato não demonstraram efeito protetor ao material genético, ou seja, são extratos neutros que não apresentam interferência da integridade do material genético da célula.

Na literatura a *L. alba* apresenta atividade genotóxica quando administrados em altas concentrações, indicando a necessidade de pesquisas adicionais com base na investigação dos efeitos desta planta em humanos, quando ministrada em diferentes concentrações. Dessa forma, devido à escassez de estudos, mais estudos são necessários para a investigação do potencial protetor de *Lippia alba*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINEE J, PIRI K, KARAMI O (2008). **Essential oil component in flower of lemon balm (*Melissa officinalis* L.)**. Biotechnology 4: p. 277-278

AGUIAR, J. S. et al. **Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 436-440, julho/setembro. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n3/a18v18n3.pdf>>. Acesso em: 19 de novembro de 2015.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. **Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário**. Revista Espaço para a Saúde, v.6, n.2, p.1-6. Londrina, 2005

ATTI-SERAFINI, L. et al. **Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill). N.E.Br grow in southern Brazil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.4, n.2, p.72-74, 2002.

BALMAIN, A.; GRAY J.; PONDER B. **The genetics and genomics of cancer**. Nature Genetics, Califórnia, v. 33, n. 1, p. 238-244, 2003. Disponível em: <http://www2.biology.uoc.gr/courses/BIO303_genetiki_anthropou/Material/Cancer_Genetics_and_Genomics.pdf>. Acesso em: 23 de novembro de 2015.

BARBARA GRAIG. **Remédios Caseiros**, 1984. Editoria Gound p. 8-15.

BARBOSA, F. da F. et al. **Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown**. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n6/13.pdf>>. Acesso em: 19 de novembro de 2015.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. **Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase**. Revista Brasileira Farmacognosia, v. 16, p. 258-285, 2006.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3 ed. p.59-71., 2008.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. **Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno**. Acta Amazonica, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v36n3/v36n3a11.pdf>>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Afiliada, 1991. p.381.

CÁCERES A, ALVAREZ AV, OVANDO AEO, SAMAYOA BE. **Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases**. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol* 31: p.193-208. 1991

CAPASSO, R. et. al. **Phytotherapy and quality of herbal medicines**. Fitoterapia, Brasil, v. 71, p. 58-65, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930714>>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

COSTA, M. do C. C. D.; AGUIAR, J. dos S.; NASCIMENTO, S. C. do. **Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p.349-352, 2004. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_1_13_TS8B71A1VT.pdf>. Acesso em 15 de novembro de 2015.

COSTA, R. M. A. et. al. **Biomonitoramento de mutagênese ambiental**. Biotecnologia: ciência e desenvolvimento, São Paulo, v. 3, n. 12, p.24-26, 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/bio12.pdf#page=24>>. Acesso em: 23 de novembro de 2015.

CURY, C. P. **Análise das células-tronco medicinais da medula óssea de ratos wistar submetidas à criopreservação**, 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2005.

DUARTE MCT, FIGUEIRA GM, SARTORATTO A, REHDER VLG, DELARMELINA C 2005. **Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants**. *J Ethnopharmacol* 97: p.305-311.

FENECH M (2000). **The in vitro micronucleus technique**. Mutation Research 455:p.81-95.

FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method**. Mutation Research , Amsterdam, v. 392, p.11-18, 1997.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D.G. **Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal**. Infarma, v.16, p.7-8, 2004.

HAYASHI, T. et al. **Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of Clostridial neurotoxins on assembly**. EMBO Journal, Alemanha, v.13, n. 21, p. 5051-5061, 1994. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/15242310_Synaptic_vesicle_membrane_fusion_complex_action_of_clostridial_neurotoxins_on_assembly>. Acesso em: 23 de novembro de 2015.

HOLETZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DAG, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP 2002. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases**. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: p.1027-1031.

JULIO, L. S. et. al. **Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva cidreira)**. Revista Brasileira de

Farmacognosia, São Paulo, v.13, p. 36-38, 2003. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2003000300014&lng=en>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

LAINETTI R, Brito ERS. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Ediouro; 1980

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. **Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils**. Genetics and Molecular Biology, Brazil, v. 34, n. 3, p. 479-488, 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3168191/pdf/gmb-34-3-479.pdf>>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. p.544

MACGREGOR, J. T. et al. **Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes**. Mutation Research, v.189, p.103-12, 1987.

MANICA-CATTANI, M.F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L. AND ECHEVERRIGARAY, S. **Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill.** (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. Braz. J. Biol., 69(2): p.375-380, 2009.

MASCOTTI, K.; McCULLOUGH, J.; BURGER, S.R. **HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide**. Transfusion, Filadelfia, v. 40, p. 693-696, 2000.

MATOS, F.J.A. **Descrição das plantas medicinais**. In: _____. Farmácias vivas. 3.ed. Fortaleza: Edições Universidade Federal do Ceará, p.107-8, 1998.

MILLER, R. C. **The Micronucleus Test as an *in vivo* Cytogenetic Method**. Environmental Health Perspectives. Institute for Medical Research Camden, Nova Jersey, 1973.

MILLIKEN, W.; Albert, B., 1997. **Plantas Medicinais dos Yanomami**. Uma Nova Visão dentro da Etnobotânica de Roraima. In: Barbosa, R.I. Ferreira, E. & Castellón, E. (eds.), Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p.85-110

MILLIKEN, W. 1997. **Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil**. Economic Botany, 51(3):p.212-237.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde seleciona projetos de plantas medicinais e fitoterápicos 2014**. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/19833-ministerio-da-saude-seleciona-projetos-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos>.
 Acesso em 22 de novembro de 2015.

Oliveira AC 2000. **Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura**. João Pessoa, p.86. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos alimentos - Universidade Federal da Paraíba.

PESSINI GL, HOLETZ FB, SANCHES NR, CORTEZ DAG, DIAS-FILHO BP, NAKAMURA CV 2003. **Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular**. *Rev Bras Farmacogn* 13 (Supl. 1): p.21-24.

RAO GP, SINGH M, SINGH P, CATALAN C, KAPOOR IPS, SINGH OP, SINGH G 2000. **Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill)**. *Indian J Chem Technol* 7: p.332-335.

REIS, E. S. et al. **Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura**. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009. Disponível em:
<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/download/765/765>.
 Acesso em: 19 de novembro de 2015.

RIBEIRO, P. G. F.; DINIZ, R. C. **Plantas Aromáticas e Medicinais: Cultivo e Utilização**. Londrina: IAPAR. 2008.

SALVADORI, D. M F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. **Teste do micronúcleo em células humanas in vitro**. *Mutagênese Ambiental*, Canos, ULBRA, 1º ed, p. 201-219, 2003.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; NATARAJAN, A. T. **The anticlastogenicity of bcarotene evaluated on human hepatoma cells**. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 303, p.151– 156,1993.

SANTOS MMFB 1996. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) isolado de *Citrus* sp**. São Paulo, p.105. Dissertação de Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R. **Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira**. *Horticultura Brasileira*, Campinas, v. 22, n. 2, p.182-185, 2004.

SÃO PAULO. VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2000. **Saúde é Vital**. Curas alternativas. São Paulo: Ed. Azul, ed. especial; 1991. Acesso em 23 de novembro de 2015.

SCHULZ, V;HANSEL. R;TYLER V. E. **Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da Saúde** . 4ª. Edição, São Paulo: Editora Manole, 2002

SENA FILHO JG, MELO JGS, SARAIVA AM, GONÇALVES AM, PSIOTTANO MNC, Xavier HS 2006. **Antimicrobial activity and phytochemical prolife from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.** *Rev Bras Farmacogn* 16: p.506-509.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos.**

Sigma-Aldrich, 2013. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=129925&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F129925%3F1ang%3Dpt>>. Acesso em: 23 de novembro de 2015.

SOARES L 2001. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (falsa melissa) Vernbenaceae.** p.112.

Dissertação de Mestrado em Farmácia - Universidade Federal de Santa Catarina.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sus tem fitoterápicos para doenças simples.**

Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: compêndio de fitoterapia.** Paraná, 2001. p.317.

VEIGA-JUNIOR, V. F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2008000200027&script=sci_arttext> . Acesso em: 23 de novembro de 2015.

VOGEL, E.W. **Caprolactam induces genetic alterations in early germ cell stages and in somatic tissue of *D. melanogaster*.** *Genetica Toxicológica*, v.224, n.3, p.339-342, 1989.

WONG, A. et. al. Aspectos toxicológicos dos fitoterápicos. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, São Paulo, v.1, p. 96-102, 2003. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n2/a15v42n2.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

YUNES, R.A. E FILHO, V.C. **Breve análise histórica da química da Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental.** In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

ZELNICK, R. D. et al. **Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from *Coleus barbatus* Benth.** *Tetrahedron*, v. 33, p.1457-1467, 1977.