

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MAITE DORADOR PORFIRO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE
Lippia alba, EM LINFÓCITOS HUMANOS**

BAURU

2015

MAITE DORADOR PORFIRIO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS
DE *Lippia alba*, EM LINFÓCITOS HUMANOS**

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

BAURU

2015

P835a	<p data-bbox="548 1291 841 1325">Porfírio, Maite Dorador</p> <p data-bbox="548 1360 1284 1503">Avaliação das atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcóolicos de lippia alba, em linfócitos humanos / Maite Dorador Porfírio. -- 2015. 26f. : il.</p> <p data-bbox="591 1541 1235 1575">Orientadora: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.</p> <p data-bbox="548 1612 1284 1711">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1749 1284 1852">1. Erva-cidreira. 2. Lippia alba. 3. Aberração Cromossômica. 4. Clastogênicidade. 5. Linfócito. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.</p>
-------	---

MAITE DORADOR PORFIRIO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *Lippia alba*,
EM LINFÓCITOS HUMANOS**

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

Banca examinadora:

Bióloga Thais Bernardes de Queiroz

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho

Prof^a. Dr^a. Marilanda Ferreira Bellini

Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 1º de dezembro de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais, e toda minha família, que sempre me apoiaram e estiveram sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado e me iluminado até chegar onde estou hoje.

Agradeço aos meus pais Silvana e João, por terem me permitido chegar a uma graduação, apoiado meus passos sempre e, acima de tudo, confiando em mim e na minha capacidade, sempre me recobrando de amor.

Agradeço também a minha orientadora, a Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, que sempre esteve disposta a me ajudar, com paciência e carinho, desempenhando perfeitamente seu papel profissional, ajudando-me a caminhar, e crescer em minha futura profissão.

A bióloga, Thaís Bernardes de Queiroz, que desempenhou um importante papel, do início ao fim, sempre ajudando e guiando pelo projeto.

As minhas companheiras de projeto, Ana Gabrielle Scarpin Pellegatti e Bruna Fernanda Conti, que estiveram comigo durante toda caminhada até aqui, me ajudando sempre e trocando conhecimento.

Às meninas que estiveram durante todo este ano ao meu lado, Debora Bassan, Flavia Andrade e Rafaela Marques, que souberam lidar com toda expectativa de chegar até o final desta etapa.

As minhas amigas Caroline Kuwabara, Caroline Romani, Camila Chiarato, Julia Lopes, Lenize Vargas, Marielle Pereira, Nicoli Moreno, que durante quatro anos se tornaram parte essencial da minha formação. E outras que mesmo distante sempre me apoiaram.

Agradeço, enfim, a todo corpo docente da Universidade Sagrado Coração, do curso de Biomedicina, que me trouxeram todo conhecimento necessário, para que futuramente eu me torne uma excelente profissional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

Que os vossos esforços
desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas
do homem foram conquistadas do que
parecia impossível. (Charles Chaplin).

RESUMO

Atualmente o uso de extratos naturais como fármacos tem tomado grandes proporções, pois concilia o baixo custo, com a 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 como sedativo. Alguns estudos comprovam a eficácia de substâncias presentes no óleo essencial extraído da *Lippia alba*, e também observa-se efeitos ansiolíticos, citostáticos, anticonvulsivantes e antiulcerogênicos. Neste estudo, realizou-se a análise de viabilidade celular pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, clastogênica e anticlastogênica dos extrato etanólico (EE - 100 µg/mL) e metanólico (EM - 100 µg/mL) de *Lippia alba* associados ou não ao agente indutor de dano metilmetanosulfonato (MMS - 1 µg/mL), respectivamente, por meio de ensaios de aberração cromossômica, feitos em culturas de linfócitos humanos. Para isto, foram coletadas amostras de sangue periférico de 4 indivíduos adultos, saudáveis, de ambos os sexos. A viabilidade celular foi > 99% em todos os tratamentos, indicando que os extratos de *Lippia alba* não interferem na viabilidade. Já as análises de aberrações cromossômicas, indicam que os extratos não são clastogênicos, pois o número de células com aberrações cromossômicas não se diferenciou estatisticamente do controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO - 30µL). Apesar da análise estatística não ter sido significativa, a análise dos resultados indica atividade anticlastogênica biologicamente significativa, sendo que MMS apresentou $5,35 \pm 2,78$ células com alterações cromossômicas, enquanto que EE+MMS ($0,00 \pm 0,00$) e em EM+MMS ($1,57 \pm 1,85$), foram muito próximos do valor de Controle negativo ($1,19 \pm 1,78$). Desta forma, sugere-se que os extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba* não induzem dano e podem proteger o material genético perante danos induzidos por MMS.

Palavras-chaves: Erva-cidreira. *Lippia alba*. Aberração Cromossômica. Clastogenicidade. Linfócitos.

ABSTRACT

Currently the use of natural extracts as drugs, is taken in major quantities because it combines low cost with high efficiency. The lemongrass *Lippia alba*, also known as lemon-of-bush, is a plant that stands out because of their great therapeutic potential and can be used from a cold treatment and even as a sedative. Some studies support the efficacy of the substance present in the essential oil extracted from *Lippia alba*, and also observed anxiolytic effects, cytostatics, anticonvulsants and antiulcerogênicos. In this study, there was cell viability analysis by Trypan Blue Exclusion Method, clastogenic and anticlastogênica of ethanol extract (EE - 100 mg / mL) and methanol (MS - 100 mg / mL) associated *alba Lippia* or not the inducing agent metilmetanosulfonato damage (MMS - 1 / ml), respectively, by means of chromosomal aberration assays performed in human lymphocyte cultures. For this, peripheral blood samples were collected from four adult subjects, healthy, male and female. Cell viability was > 99% in all treatments, indicating that *Lippia alba* extracts did not affect viability. As for the analysis of chromosomal aberrations, indicate that the statements are not clastogenic, since the number of cells with chromosomal aberrations did not differ statistically from the negative control (dimethyl sulfoxide - DMSO - 30 μ L). Despite not being statistically significant analysis, analysis of the results indicates biologically significant anticlastogênica division, which had 5.35 ± 2.78 MMS cells with chromosomal abnormalities, while EE + MMS (0.00 ± 0.00) and IN + MMS (1.57 ± 1.85), very close to the value of negative control (1.19 ± 1.78). Thus, it is suggested that the ethanol and methanol extracts from *Lippia alba* not induce injury and may protect the genetic material against damage induced by MMS.

Keywords: Lemon balm. *Lippia alba*. Chromosome aberration. Clastogenicity. lymphocytes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 USO DE PLANTAS NA MEDICINA POPULAR.....	10
1.2 ERVA – CIDREIRA	11
1.3 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E Brown	12
2 OBJETIVO.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	15
3.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	15
3.3 CULTURA CELULAR	15
3.4 AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA.....	16
3.5 TRATAMENTOS	16
3.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	17
3.7 TESTE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	17
3.8 ÍNDICE MITÓTICO.....	17
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	19
5 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

1.INTRODUÇÃO

1.1 USO DE PLANTAS NA MEDICINA POPULAR

Atualmente muito se fala sobre a utilização das plantas medicinais, que tem sido empregadas na cura de doenças, e uma possível melhoria na qualidade de vida, ainda mais quando se pensa que muitas destas plantas tiveram eficácia comprovada. (RIGOTTI, 2010).

Uma grande parcela da população faz uso de fármacos naturais devido os mesmos serem menos invasivos e prejudiciais ao organismo, enquanto que os fármacos atuais, sintéticos, tem um alto custo e se tornam mais agressivos. Também leva-se em conta o fácil acesso a tais medicamentos. (SANTOS, 2011).

Um medicamento passa a ser considerado fitoterápico quando em sua composição existir partes de plantas medicinais, de suas sementes até suas raízes. Desde o momento em que se pensa no preparo do fitoterápico, leva-se em conta suas propriedades terapêuticas.

Devido ao grande desenvolvimento e conhecimento na área dos fármacos, os mesmos estão ganhando maior espaço terapêutico, e sua recomendação por profissionais da saúde vem aumentando, mesmo que para seu uso correto precisem orientar os pacientes. (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005; SANTOS et al., 2011).

Porém as plantas medicinais se tornam um problema preocupante quando se pensa na origem das mesmas, pois a forma como são cultivadas, vendidas, e expostas em alguns locais, pode torna-las um risco para a saúde. As mesmas deveriam ser embaladas de forma adequada para o “consumo”, para que não perdessem seu princípio ativo, e não se tornassem fonte de contaminação para microrganismos. (RIGOTTI, 2010).

O modismo do uso das plantas medicinais, está trazendo esse assunto para a mídia de uma forma muito natural, o que de certa forma gera aos leitores, telespectadores, ouvintes, um certo risco na utilização, pois na maioria das vezes, as pessoas que passam certas informações são leigos no assunto tratado, despertando nos que recebem a informação, certa curiosidade, causando o uso incorreto, e tornando-o ineficaz. Inclusive, a televisão por ser o meio de informação, do qual a maioria do público tem mais contato, vem trazendo muitas informações que normalmente seriam encontradas em revistas científicas, como contato, com

profissionais capacitados para esclarecer dúvidas sobre esta nova “terapia”. (RIGOTTI, 2010).

Arnous e colaboradores 2005, demonstraram que grande parte da população de baixa renda, recorre a tratamentos com baixo custo e que não tragam malefícios a saúde. Muitas das pessoas que foram envolvidas nas pesquisas afirmaram que o “conhecimento” sobre plantas medicinais vem de históricos familiares, e uma pequena parcela (uma única pessoa), 0,2%, dos que foram entrevistados, afirmou que foi guiada por um profissional da saúde até este tipo de tratamento. Nessa mesma pesquisa, mais da metade dos envolvidos disseram que cultivam este tipo de plantas medicamentosas, até mesmo em seus quintais, ou seja, do plantio ao consumo, feito de forma errônea. Muitos dos entrevistados afirmam recorrer primeiramente a plantas medicinais antes de procurar um profissional da saúde.

A cultura popular, e a grande biodiversidade brasileira, são fontes para pesquisas científicas, que deram origem a maioria dos medicamentos disponíveis atualmente. O Brasil então, torna-se exemplo quando o assunto é a aplicação desta nova linhagem de medicamento, uma medicina não convencional, alternativa, advinda de um conhecimento tradicional. (ANVISA, c2011).

1.2 ERVA – CIDREIRA

A erva-cidreira é uma das plantas medicinais que vem sendo muito utilizada na medicina popular, devido à seu potencial ansiolítico. Diferentes espécies respondem pela popular erva-cidreira, entre elas pode ser destacado: *Aloysia citrodora* Palau (família *Verbenaceae*), *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown (família *Verbenaceae*), *Melissa officinalis* L. (família *Lamiaceae*) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (família *Poaceae*). (SIMÕES, et al., 2001). Porém o nome popular é dado dependendo onde se encontra certa espécie, podendo se diferenciar de região para região. (SENA FILHO et al., 2006).

Algumas dessas espécies podem ser bem utilizadas como antigripal, anti-inflamatório, analgésico. (AGUIAR et al., 2008).

1.3 *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown

A *Lippia alba* (Mill.), é uma planta originária dos Andes (Chile e Peru), e pode ser encontrada por todo o Caribe, na América Central e América do Sul (sendo considerada nativa dessa região) e na África tropical (LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011), sendo bem reconhecida por ser planta medicinal. (HEINZMANN; BARROS, 2007).

A erva-cidreira é encontrada por todo território brasileiro (COSTA, AGUIAR, NASCIMENTO, 2004) e em cada região ela é nomeada popularmente, como cidreira-de-arbusto ou alecrim selvagem no Sudeste, ou somente erva-cidreira, como é conhecida no Nordeste do país. (BARBOSA, 2006).

Quando preparada, a *L. alba* se torna útil na medicina popular, podendo ser um método de tratamento para inúmeras doenças, que vão desde uma cólica, até mesmo um calmante para o combate da hipertensão, ou um sedativo. (HEINZMANN; BARROS, 2007). A *Lippia alba* tem efeitos terapêuticos comprovados cientificamente, entre eles o que mais se destaca é sua propriedade analgésica. (STEFANINI; RODRIGUES E MING, 2002).

Fazendo parte da família Verbenaceae, (SENNA FILHO, 2006) esta erva cidreira é encontrada na forma de um arbusto aromático, que atinge cerca de 3 m de altura. (COSTA, AGUIAR, NASCIMENTO, 2004) (Figura 01).

O seu aroma é variável de acordo com a estação do ano, a idade da planta, o quanto de água circula na mesma, existência de microrganismos. (COSTA, AGUIAR, NASCIMENTO, 2004).

Costa, Aguiar e Nascimento realizaram um estudo onde o objetivo era comprovar, que a partir do cultivo da planta de modo padronizado, o extrato bruto extraído dessas, confirmava que as condições de cultivos mantinham os princípios ativos de ação antimicrobiana, que tinham a mesma eficácia apresentada em outros estudos, na inibição dos microrganismos que estavam dispostos para teste. (COSTA, AGUIAR, NASCIMENTO, 2004).

Em outro estudo, comprovou-se que o óleo essencial da *Lippia alba* tem uma atividade antimicrobiana contra microrganismos gram-positivos, com um MIC (concentração inibitória mínima) girando em torno de 0.310 mg / mL, justificando assim, o interesse no potencial medicinal desta planta. (FILHO, 2006).

Ainda falando sobre o óleo extraído da *Lippia alba*, existe uma grande preocupação quando esses, se tornam base para o fármaco, tendo em vista que existem inúmeros quimiotipos presentes.

No Brasil, em especial no estado do Pará, citral, limoneno, carvona, e 1,8-cineol estão entre os quimiotipos encontrados. Já na Guatemala os principais componentes encontrados nos óleos essenciais da espécie são o limoneno e piperitona. Outros países como o Uruguai, foram alvo das pesquisas, e lá foi encontrado o quimiotipo linalol. E, por fim, na Colômbia foi encontrado carvona e limoneno, como os principais quimiotipos. Essa grande variabilidade se torna preocupante devido à vasta comercialização da *Lippia alba* como medicamento, sabendo que a base para estes fármacos, são os óleos essenciais. (MANICA-CATTANI, 2009).



Figura 1 Arbusto de Lippia alba

Fonte: HERBIA COSMETICOS 2015

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcóolicos de *Lippia alba*, *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Investigar a indução de aberrações cromossômicas, pelos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba*, em cultura de linfócitos humanos;

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho é um subprojeto do projeto “Anti/Clastogenicidade de duas espécies de erva-cidreira: *Lippia Alba* e *Melissa officinalis*”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CEP/USC No. 382.227). Para realização do trabalho, foram coletadas amostras de sangue periférico de 4 indivíduos adultos e saudáveis, de ambos os sexos, 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.

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Lippia alba* utilizado no estudo foi obtido na Fazenda Experimental Lageado, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu/SP, da coleção de plantas medicinais existente em canteiros do Setor de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas. Os extratos metanólico e etanólico, utilizados neste trabalho, foram preparados no Laboratório de Controle Físico-químico de Medicamentos (USC), segundo Zelnick et. al. (1977), pela bióloga Thaís Bernardes de Queiroz em seu trabalho de conclusão de curso. (QUEIROZ; BELLINI, 2013), sob supervisão do Prof. Me. Fernando T. A. Neves.

3.3 CULTURA CELULAR

A cultura de linfócitos foi obtida a partir de sangue total de 4 voluntários adultos e saudáveis, de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 35 anos, sem histórico de doenças recentes, não-fumantes, sem exposição recente a radiações ou medicamentos. Foram coletados 7 mL 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 4 mL de meio RPMI 1640 com HEPES (Cultilab, Brasil), 1 mL de soro fetal bovino (Inativado, estéril, isento de mycoplasma

– Cultilab, Brasil), 100 µL de fitohemaglutinina A (Gibco, USA, Cat.# 10576-015), e 100 µL de penicilina-estreptomicina (Gibco, USA, Cat.# 15140-148), adicionou-se aproximadamente 0,5 mL de sangue periférico, o qual foi incubado a 37°C em estufa (502 FANEM – São Paulo – Brasil), por 48 horas. Após esse período, os tratamentos de mutagenicidade e antimutagenicidade foram realizados. As culturas foram realizadas entre 2013 e 2014.

3.4 AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA

Para a indução de danos no DNA utilizou-se 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 é 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, a 1 µg/mL.

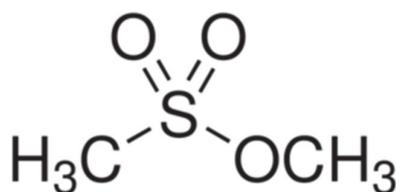


Figura 2 Estrutura Molecular de Metilmetanosulfonato.

Fórmula Linear CH₃SO₃CH₃.

Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

3.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram realizados simultaneamente por 24h. Como segue:

- a. Controle Negativo (30 µL de DMSO);
- b. Controle Positivo - Agente Indutor de Dano (1 µg/mL de MMS);

- c. Extrato etanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL);
- d. Extrato metanólico de *Lippia alba* (100 µg/mL);
- e. Extrato etanólico de *Lippia alba* + MMS (100 µg/mL + 1 µg/mL de MMS);
- f. Extrato metanólico de *Lippia alba* + MMS (100 µg/mL + 1 µg/mL de MMS);

3.6 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 µL de meio RPMI 1640 com Hepes. Posteriormente, foram coletados 10 µL desta suspensão celular, juntamente com 10 µL 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).

3.7 TESTE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Uma hora e trinta minutos antes de completar às 72 horas de incubação, aplicou-se 100 µL de Colchicina 0,016% (CULTILAB, BRASIL) em cada frasco de cultura. Os frascos foram homogeneizados e devolvidos a estufa, 37°C, até completar as 72 horas. Os procedimentos para a colheita e a fixação foram baseados em Wu, Zheng e Hsu (2005), com modificações. Ao término da colheita e fixação, o material foi armazenado à -4°C, até o momento da análise. A análise foi realizada em microscópio de luz, contando 100 metáfases por tratamento/voluntário, analisando o número e a integridade cromossômica.

3.8 ÍNDICE MITÓTICO

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

Sendo que:

m = número de células em metáfase

T = número total de células (metáfases + Interfases)

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, pode-se verificar que todos os tratamentos foram viáveis (> 99%) (Tabela 01).

Tabela 1- Avaliação de viabilidade celular dos extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown em linfócitos humanos, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan.

Tratamentos	Viabilidade Celular
	Média ±DP
Controle Negativo (DMSO)	99,97 ± 0,031 ^{ns}
Controle Positivo (MMS)	100,00 ± 0,000 ^{ns}
Clastogenicidade	
EE <i>L. alba</i>	99,96 ± 0,038 ^{ns}
EM <i>L. alba</i>	99,98 ± 0,012 ^{ns}
Anticlastogenicidade	
EE <i>L. alba</i>	100,00 ± 0,000 ^{ns}
EM <i>L. alba</i>	99,97 ± 0,021 ^{ns}

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

O índice mitótico observado foi baixo, variando entre 9,07±5,26 em EM+MMS até 25,25± 14,42 em MMS, indicando que os tratamentos com os extratos podem ter afetado a divisão celular, entretanto esses dados não foram estatisticamente significativos (Tabela 2). Após a análise dos experimentos de aberrações cromossômicas, foi possível verificar que os extratos alcoólicos de *Lippia alba* não apresentam atividades clastogênicas em cromossomos de linfócitos humanos, pois o controle negativo apresentou 1,19 ± 1,78 células com aberração cromossômica, enquanto que nos tratamentos foi observado em EE, 0,7627± 0,763 e em EM, 1,03 ± 1,034. Já o controle positivo (MMS) apresentou 5,35 ± 2,78 células com aberrações, e seus tratamentos em EE+MMS (0±0) e em EM+MMS (1,57± 1,847). Considerando estes resultados, infere-se que os extratos podem apresentar atividades anticlastogênica, entretanto, não é estatisticamente significativo (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação de atividade clastogênica e anticlastogênica de extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown pelo teste de aberração cromossômica em linfócitos humanos

Tratamentos	Índice Mitótico (%)	Células com aberrações cromossômicas	Tipos de Aberrações cromossômicas
	Média ± DP	Média ± DP	
Controle Negativo (DMSO)	21,35 ± 12,42 ^{ns}	1,19±1,78 ^a	2 QCT, 1Re, 1QCM
Controle Positivo (MMS)	25,25 ±14,42 ^{ns}	5,35±2,78 ^b	4 QCT, 4Re, 5QCM, 1QCN, 3 Gap, 1 Gap cromátidico, 1 Dic
Clastogenicidade			
EE <i>L. alba</i>	17,32 ± 11,07 ^{ns}	0,76±0,76 ^a	1 QCT, 2 anel
EM <i>L. alba</i>	9,07 ± 5,26 ^{ns}	1,03±1,03 ^a	3 Re, 1 anel
Anticlastogenicidade			
EE <i>L. alba</i> + MMS	16,77 ± 16,11 ^{ns}	0,00±0,00 ^b	-
EM <i>L. alba</i> + MMS	9,87 ± 5,11 ^{ns}	1,57±1,85 ^b	4 QCN, 2 anel, 1 Gap

DMSO dimetilsufóxido; MMS metilmetanosulfonato; EE= extrato etanólico; EM= extrato metanólico; Símbolo de média ±; DP desvio padrão; ns= não significativo; a, b Teste t-Student pareado, unicaudal, tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$); QCT, quebra cromátidica; Re, rearranjo; QCM, quebra cromossômica, Dic, cromossomo dicêntrico; GAP, gap cromossômico; QCN quebra centromérica.

Fonte: elaborado pelas autoras.

Estudos feitos por Costa, Aguiar e Nascimento (2004), avaliaram a citotoxicidade dos extratos da *Lippia alba* frente a diferentes linhagens celulares de carcinomas. Neste estudo foi testado extratos etanólicos das folhas da *Lippia alba* onde o mesmo foi capaz de sensibilizar células HEp-2 que fazem parte de tumor primário de laringe. O mesmo extrato, porém retirado da raiz da *Lippia alba*, foi testado em células NCI-H292, e apresentou resultados citotóxicos significativos. O extrato metanólico retirado das folhas, apresentou atividade citotóxica frente as células HEp-2. Nos tratamentos e resultados analisados, foi possível comprovar que a *L. alba* exibiu uma ação citotóxica perante as células NCI-H292, que é da linhagem de celular mucoepidermóides, que se obteve a partir de carcinoma de pulmão humano. Em um estudo feito por Mesa-Arango e colaboradores, não foi observada ação citotóxica com citral, que é um dos compostos do óleo essencial da *Lippia alba* em células *Vero*, das quais fazem parte de rins de macacos verdes africanos, em contra partida observou-se a alta citotoxicidade em *HeLa*, células de linhagens tumorais. Ambos os estudos nos revelam que ainda pouco se sabe sobre a clastogenicidade dos extratos que aqui foram analisados e discutidos, todavia os mesmos podem nos levar a crer que os extratos apresentam riscos de danos a células tumorais, específicas, porém observa-se que os mesmo não agem causando danos sobre células saudáveis.

Em estudos de Aguiar 2007, foi observada a atividade dos extratos utilizados no presente trabalho, em microrganismos de diversas espécies. O trabalho foi realizado após cultivo padronizado da *Lippia alba*, e fazendo a utilização de várias partes da planta. Foi realizado antibiograma com os extratos, observando-se o poder de inibição dos extratos perante o crescimento de alguns microrganismos. Após análise, observou-se os resultados das atividades dos extratos etanólicos e metanólicos das folhas de *L. alba* para com *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* e *M. sitophila*, onde o melhor resultado foi frente a *M. luteus* e *M. sitophila*. O extrato etanólico retirado da raiz de *L. alba* apresentou atividade sobre *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. albicans* e *M. sitophila*, onde os melhores resultados dos extratos etanólico, clorofórmico e acetónico foram observados frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*; extratos clorofórmico e etanólico apresentaram bons resultados frente a *M. sitophila*. Após este estudo, observa-se que se as condições de cultivo, se mantiverem padronizadas, princípios ativos se fazem presente nos extrato, com mais eficiência na raiz, onde extratos brutos inibiram o crescimento de

S. aureus, *M. luteus*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *M. sitophila*, com halos de inibição parecidos pelos que os antibióticos padrões para esses microrganismos já apresentavam. Esta atividade antimicrobiana, possivelmente, é devida à inibição do desenvolvimento destes microrganismos, impedindo a divisão celular dos mesmos. Os extratos testados no presente trabalho não apresentaram alteração estatisticamente significativa em relação ao índice mitótico, entretanto, acredita-se que ocorreu uma alteração biológica significativa, dado que corroboraria os dados de Aguiar et al (2007).

Em pesquisa realizada por Queiroz e Bellini (2013) a com extrato aquoso da mesma planta, observou-se que a viabilidade celular, pelo método Azul de Trypan, foi de 97%, foi menor que o encontrado, quando fez a utilização do extrato alcoólico, onde a porcentagem de células viáveis chegou a 99%, porém em ambos os estudos, indicam inexistência de citotoxicidade. Ao comparar a integridade cromossômica de ambos os trabalhos, mesmo que trabalhados com diferentes extratos, foi possível perceber que os cromossomos se mantiveram íntegros em sua maioria, ou seja, não houve efeito clastogênico em nenhum dos ensaios.

5 CONCLUSÃO

A análise dos resultados sugere que os extratos etanólico e metanólico de *Lippia alba* não induzem aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, entretanto, quando associados ao metilmetanosulfanato infere-se que podem proteger o material genético, devido uma atividade biologicamente significativa, entretanto, não estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS

- 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, jul./set. 2008.
- 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**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun. 2005.
- 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, 349-352, abr. 2004.
- 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.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2011. v.1
- HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *lippia alba* (mill.) n. e. brown (verbenaceae). **Saúde**, Santa Maria, v 33, n 1, p 43-48, 2007.
- 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, jul-set., 2011.
- MANICA-CATTANI, M. F. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, p. 375-380, maio 2009.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 878-884, set. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n6/10.pdf>>.

QUEIROZ, T. B; BELLINI, M. F; **Análises Físico-Químicas De Lippia Alba E Melissa Officinalis E Avaliação De Clastogenicidade De Seus Extratos Aquosos Em Leucócitos Humanos**, 2013. 39 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2013.

RIGOTTI, M. Farmácia Verde – Resgate da Sabedoria Popular. Projeto “**A cura pelas plantas**”, p.3-5 2010.

SANTOS, R. L. et al. **Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SENA FILHO, J. G. et al. **Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 506-509, out./dez. 2006

SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2001.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 18-23, março 2002.