

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BRUNA FERNANDA CONTI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS
DE *Melissa officinalis*, EM LINFÓCITOS HUMANOS**

BAURU
2015

BRUNA FERNANDA CONTI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS
DE *Melissa officinalis*, EM LINFÓCITOS HUMANOS**

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 orientação da
Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

BAURU
2015

C7621a	<p data-bbox="548 1396 803 1423">Conti, Bruna Fernanda</p> <p data-bbox="548 1465 1281 1583">Avaliação das atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcoólicos de <i>Melissa officinalis</i>, em linfócitos humanos / Bruna Fernanda Conti. -- 2015. 50f. : il.</p> <p data-bbox="592 1625 1154 1652">Orientadora: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.</p> <p data-bbox="548 1694 1281 1751">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1793 1281 1871">1. Erva-cidreira. 2. <i>Melissa officinalis</i>. 3. Teste de aberração cromossômica. 4. Clastogenicidade. 5. Anticlastogenicidade. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.</p>
--------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

BRUNA FERNANDA CONTI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *Melissa
officinalis*, EM LINFÓCITOS HUMANOS**

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 orientação da Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini
Universidade do Sagrado Coração

Bióloga Thaís Bernardes de Queiroz
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Bauru, 04 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo total apoio durante o período da graduação, e incentivo durante os períodos difíceis.

A minha orientadora, principalmente pela paciência, durante as minhas inúmeras dúvidas sobre as mutações, pelos conselhos e pelas oportunidades.

A Thaís, por toda a explicação e treinamento até o entendimento do processo de análise das aberrações cromossômicas e pela elucidação de todas as dúvidas.

Às meninas: Gabriela e Maitê, pelos momentos de interação social, com muitas conversas, fofocas e risadas durante as análises de lâminas.

A Paula, que foi minha companheira na hora de corar as lâminas, ajudando em todos os momentos.

Às técnicas do laboratório de Biologia, Lígia e Fabi, com o auxílio, e disponibilidade dos horários para a pesquisa.

Ao técnico do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Wilson, pela ajuda com as técnicas empregadas.

Agradeço ao meu irmão Victor, pela leitura e sugestões para a melhoria do TCC.

E por último, à Universidade pelos meus 4 anos de graduação, onde tive acesso a um ensino de excelente qualidade.

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele.”

(Immanuel Kant)

RESUMO

Melissa officinalis é uma planta conhecida mundialmente, devido ao seu potencial antiviral, carminativo, anticolérico, ansiolítico, hipotensor, antitumoral, entre outras. É amplamente utilizada nas indústrias alimentícias e farmacêuticas como planta medicinal, em chás, infusões e óleos. Devido à escassez de estudos que avaliam a ação mutagênica, esse trabalho tem como finalidade investigar o efeito clastogênico e anticlastogênico dos extratos metanólico e etanólico de *M. officinalis*, em teste de aberração cromossômica e viabilidade celular em linfócitos humanos. Para tal, foram coletados 7 mL de sangue periférico de 6 voluntários com uma seringa heparinizada, sendo colocados em meio RPMI, em conjunto com o soro fetal bovino, fitohemaglutinina A e penicilina-estreptomicina, e incubados a cerca de 37°C por 48 horas. Posteriormente, foram iniciados os tratamentos de clastogenicidade e anticlastogenicidade, que consistiam no controle negativo (30µL de DMSO – dimetilsulfóxido), controle positivo (metilmetanosulfonato – 1µg/mL de MMS), extrato etanólico de *M. officinalis* (100µg/mL), extrato metanólico de *M. officinalis* (100µg/mL), extrato etanólico de *M. officinalis* + MMS; extrato metanólico de *M. officinalis* + MMS, realizados simultaneamente por 24 horas. Para a conservação das células em metáfases, foi adicionado 0,016% de colchicina antes do término dos tratamentos. Cerca de 10 uL da suspensão celular foram coletados para a realização da viabilidade celular através do método de exclusão de Trypan, com a contagem das células não-coradas (vivas) divididas pelo total de células contadas (coradas e não-coradas). O preparo das lâminas de aberrações cromossômicas foi realizado com Giemsa a 8% e a análise feita em microscopia de luz, com aumento da objetiva de 1000X, contando 100 metáfases com 46 cromossomos, apresentado alterações ou não, por voluntário/tratamento. Os resultados apresentaram uma viabilidade celular superior a 99% em todos os tratamentos, sem a existência de citotoxicidade dos extratos de *M. officinalis*. As análises de aberrações cromossômicas indicaram que o extrato etanólico de *M. officinalis* não possui ação clastogênica e nem efeito anticlastogênico, não apresentando diferenças significativas no teste t-Student. Enquanto que o extrato metanólico apresentou clastogenicidade, mas não potencial anticlastogênico.

Palavras-chave: Erva-cidreira. *Melissa officinalis*. Teste de aberração cromossômica. Clastogenicidade. Anticlastogenicidade.

ABSTRACT

Melissa officinalis is a world-renowned plant because of your antiviral potential, carminative, anti-angry, anxiolytic, hypotensive, anti-tumour, among others. Largely utilized in food and medicine industry as medicinal plant, in teas, infusions and oils. Due the scarcity of study that evaluate the mutagenic action, this work has the finality to investigate the clastogenic and anticlastogenic effect of *M. officinalis*, in the methanolic and ethanolic extracts, in chromosomal aberration test and cellular viability in human lymphocytes. For it were collected 7 mL of peripheral blood of 6 volunteers with heparinized syringe, being inserted in RPMI, together with fetal bovine serum, phytohemagglutinin A and Penicillin-Streptomycin, and incubated in the fence of 37°C for 48 hours. Starting after it, the treatment of clastogenicity and anticlastogenicity, that consist in the negative controle (30µL DMSO – dimethylsulfoxide), positive control (metilmetanosulfonato - 1µg / ml MMS), ethanol extract of *M. officinalis* (100µg / L), ethanol extract of *M. officinalis* (100µg / ml), ethanol extract of *M. officinalis* + MMS; methanol extract of *M. officinalis* + MMS, performed simultaneously during 24 hours. For the cells conservation in metaphase, was added 0,016% of colchicine before the end of treatments. About 10 uL of the cellular suspension was collected for the realization of cellular viability test through of Trypan exclusion method, with count of non-stained cells (living) divided for the total of cells counted (stained and non-stained). The preparation of the slides of chromosomal aberrations was realized with Giemsa 8% and the analyse done in light microscopy, with increased of objective lens of 1000X, counting 100 metaphase with 46 chromosomes, presenting changes or not, per volunteer / treatment. The results show one cellular viability superior to 99% in all the treatment, without the existence of cytotoxicity of the *M. Officinalis* extracts. The analyses of chromosome aberration has showed that the ethanoic extract of *M. officinalis* does not have clastogenic action and neither anticlastogenic effect, does not showing any significant difference in the t-Student. While the methanoic has showed clastogenic action, but not anticlastogenic.

Keywords: *Lemon balm. Melissa officinalis.* Chromosomal aberration test. Clastogenicity. Anticlastogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metáfase Normal, 46 cromossomos, aumento final de 1000x	21
Figura 2 - Cromossomo em anel, aumento final de 1000x	22
Figura 3 - Cromossomo dicêntrico e rearranjo complexo, aumento de 1000x	22
Figura 4 - Quebra cromossômica, aumento de 1000x	23
Figura 5 - Quebra cromatídica, aumento de 1000x	23
Figura 6 - Rearranjo complexo, aumento de 1000x	24
Figura 7 - Double minute, aumento final de 1000x.....	24
Figura 8 - Estrutura Molecular Metilmetanosulfonato. Fórmula linear $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólico e etanólico de <i>Melissa officinalis</i> , Stapf (100 µg/mL) em linfócitos humanos, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan.....	32
Tabela 2 - Avaliação de clastogenicidade e anticlastogenicidade de extratos metanólicos e etanólicos de <i>Melissa officinalis</i> (100 µg / mL) em cultura de linfócitos humanos.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	<i>Melissa officinalis</i>	12
2.2	FITOTERÁPICOS E MEDICINA POPULAR.....	14
2.3	FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE das plantas medicinais.....	15
2.4	FALTA DE CONHECIMENTO E CONSEQUENTEMENTE O MAU USO.....	16
2.5	MUTAÇÃO.....	16
2.6	TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	18
2.7	GENÉTICA TOXICOLÓGICA.....	19
2.8	MUTAÇÕES ESTRUTURAIS.....	20
2.9	ANTIGENOTOXIDADE E <i>Melissa officinalis</i>	24
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	28
5.2	CULTURA CELULAR.....	28
5.3	AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA.....	29
5.4	TRATAMENTOS.....	30
5.5	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	30
5.6	TESTE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	30
5.7	ÍNDICE MITÓTICO.....	31
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6	RESULTADOS	32
7	DISCUSSÃO	35
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - Nº. 382.227	48
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)	50

1 INTRODUÇÃO

Existem plantas que são utilizadas dentro da medicina popular como remédios caseiros, sendo empregadas como chás, ou na forma de pós e alimentos. Uma das plantas mais utilizadas é a *Melissa officinalis*, popularmente conhecida como erva cidreira, que é utilizada mundialmente, devido a sua ação antiviral, carminativa, anticolérica, ansiolítica, hipotensora, antitumoral e neuroprotetora. Utilizada na maioria das vezes através de infusões das suas folhas, e com consumo descomedido. O que pode ser um problema, pois quando utilizada em excesso pode acarretar algumas consequências para a saúde; da mesma maneira que o uso em baixas concentrações não atingem os efeitos esperados.

Além de ser utilizada na medicina popular, também pode ser empregada como fitoterápico, que consiste na industrialização da planta medicinal com o intuito de obter um medicamento no final do processo. Enquanto que as plantas medicinais são passadas através das gerações, sendo classificada como uma tradição de uma determinada comunidade.

Dentre as plantas medicinais existem algumas que possuem potencial clastogênico, ou seja, podem atuar no DNA, ocasionando alterações estruturais, classificadas em: quebras cromossômicas, quebras cromatídicas, cromossomos em anel, cromossomos dicêntricos, rearranjos complexos e *double minutes*. Por outro lado existem plantas medicinais com potencial anticlastogênico, desta forma prevenindo danos ao material genético e consequentemente possíveis doenças a longo prazo, causadas por acúmulos de danos ao DNA.

Para estudar as mutações e o potencial mutagênico, a genética possui uma área específica, conhecida como genética toxicológica, que também estuda o desenvolvimento de câncer devido à presença constante de mutações. Uma ferramenta utilizada por esta ciência é o teste de aberração cromossômica, que torna possível determinar o potencial clastogênico e anticlastogênico de óleos, extratos, soluções, entre outras substâncias. Sendo assim, através desta técnica é possível analisar os extratos metanólicos e etanólicos da *M. officinalis*, verificando se os mesmos apresentam potencial clastogênico ou anticlastogênico através da quantificação das alterações encontradas nas metáfases, em cultura de linfócitos humanos *in vitro*.

Levando em conta o grande consumo da *Melissa officinalis* e a escassez de

trabalhos realizados com o intuito de avaliar seu potencial de proteção ou degeneração ao DNA este trabalho tem como principal objetivo avaliar tais potenciais da mesma; para assim, auxiliar a população através da verificação da segurança do consumo desta planta e também de uma melhor conscientização dos efeitos provocados pela mesma no organismo humano e em seu material genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão literária deste trabalho foi baseada na análise exploratória de dados acerca da *Melissa officinalis*, tais quais, a elucidação de termos utilizados na medicina popular, como fitoterápicos e plantas medicinais; além de efeitos nocivos da mesma, sejam causados devido ao seu mal uso ou não; assim como seus efeitos benéficos. Além de temas correlatos a mutações estruturais, encontradas no teste de aberrações cromossômicas, e a relação da toxicologia com a genética.

2.1 *Melissa officinalis*

Melissa officinalis se encontra dentro da família *Lamiaceae*, e é caracterizada pelo odor semelhante ao limão, que se torna mais evidente quando a planta é seca. (REIS et al., 2009), devido à presença do citral, um metabólico secundário. (COLUSSI et al., 2011). Segundo Mengue (2001), ela pode atingir aproximadamente 80 cm de altura, com a presença de folhas opostas e ovaladas, com cerca de 7 cm de comprimento e bordas dentadas.

M. officinalis é uma planta largamente utilizada pela população de todo o mundo e dependendo da região, é conhecida por diferentes nomes populares: erva cidreira verdadeira, chá de frança, cidrilha, chá de tabuleiro, citronela, citronela-menor, erva-luísa, limonete, melitéia, salva-do-brasil, melissa romana. (MEIRA; SOUZA; MARTINS, [2010?]), “[...] anafa, cidreira, capim cheiroso, capim-cidreira, jacapé, *melissa* (Itália), *melisa* (Argentina), *toronjil*, *lemon balm* (Inglaterra), *mélisse* (França).” (KRAUSE, [2012?]).

O principal composto encontrado na porcentagem de (2-40) é o citronelal, seguido do composto citral - constituído da mistura de neral e geranial (10-30 %) - e em menor quantidade o β -cariofileno, germancreno D, ocimeno e citronelol. (SILVA et al., 2005). Através da pesquisa da “Análise do perfil de óleos essenciais de *Melissa officinalis* (*Lamiaceae*)” foi comprovado que as substâncias majoritárias encontradas através do método de cromatografia foram o neral e geranial, assim como estava descrito na literatura. (DUARTE; MOMESSO, [2009?]).

Segundo estudos realizados com humanos, a *Melissa officinalis* tem propriedades que contribuem para a melhora do humor e do desempenho, em doses moderadas; assim como também é benéfico para combater o stress, sem todavia,

afetar a atividade cognitiva. Não houve nenhum efeito colateral durante o experimento. (KENNEDY; LITTLE; SCHOLEY, 2004). Como elucidado por Krause ([2012?]) a *Melissa officinalis* é muito utilizada dentro da medicina popular, tendo seu foco principal no tratamento de insônia, como carminativo, colerético, para inibir a tireóide e como hipotensor. Além disso, o extrato de *M. officinalis* possui ação antiviral, capaz de inibir HIV-1. (GEUENICH et al., 2008).

A maioria das plantas possuem capacidade antioxidante gerada por compostos fenólicos, capazes de eliminar radicais livres. (KAMDEM et al., 2013). São várias as funções dos compostos fenólicos nas plantas, tais quais, a capacidade de produzir substâncias químicas para a sua proteção, contra raios ultravioleta, insetos, bactérias, controle de hormônios vegetais além de servir na polinização ao atrair animais. (MÜZELL, 2006). Segundo Gazola, a *Melissa officinalis* apresenta em seu extrato aquoso, compostos fenólicos, tais como, alcalóides, taninos e flavonóides, que contribuem para seu efeito hipotensor. E essas substâncias também estão relacionadas aos resultados. Ratos foram submetidos à administração dos extratos de *Melissa officinalis* apresentaram redução da frequência cardíaca, mas a força de contração não foi afetada. (GAZOLA et al., 2004). Tanto o extrato de *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* como o da *Melissa officinalis* subsp. *inodora*, quando em alta concentração, apresentam proteção contra a oxidação por ferro. Entretanto, com a incorporação de um catalisador, o EDTA (ácido tetraacético), a atividade antioxidante é aumentada. (MARONGIU et al., 2004).

O ácido rosmarínico está presente na *M. officinalis*, em doses baixas, possuindo ação ansiolítica, todavia sem efeitos colaterais significativos, como: alterações na memória de curto e longo prazo, capacidade locomotiva e desmotivação, sintomas comuns em outros ansiolíticos. (PEREIRA et al., 2005).

Várias são as pesquisas acerca das propriedades da *Melissa officinalis*, sendo uma delas a verificação de sua capacidade de proteção contra a apoptose induzida pelo efeito do ecstasy, indicando uma possível utilização no tratamento de doenças degenerativas. (HASSANZADEH et al., 2010). Como investigado previamente através de um estudo randomizado, o extrato foi eficaz no tratamento de casos de Alzheimer moderado, além de descrita a sua capacidade sedativa. (AKHONDZADEH et al., 2003) e potencial antitumoral em câncer de mama, induzindo a apoptose nas células tumorais. (SARAYDIN et al., 2012).

2.2 FITOTERÁPICOS E MEDICINA POPULAR

Tal qual elucida a ANVISA ([2006?]), os fitoterápicos não são o mesmo que ervas medicinais, sendo que os fitoterápicos são o resultado da industrialização da planta medicinal, com o intuito de obter o medicamento como produto final, evitando as contaminações por microorganismos, agrotóxicos e algumas substâncias estranhas, enquanto que a medicina popular é tida como o uso de plantas medicinais, através da tradição do seu uso como remédio em uma comunidade, sendo preciso conhecer os procedimentos para a sua colheita e preparo.

Vários fatores induzem ao uso de plantas medicinais, como o alto preço de medicamentos e os efeitos colaterais que estes provocam. Mas, também é preciso levar em consideração que o pensamento de que o natural é benéfico à saúde é errôneo. (SILVA; SOUZA; CORTEZ, 2009), pois desde antigamente as plantas são utilizadas devido a sua produção de veneno e potencial tóxico, que desenvolvem com o intuito de se proteger de seus predadores. (MENGUE; MENTZ; SCHENKEL, 2001).

Outro fator a ser levado em consideração é a importância da utilização da dosagem correta do fitoterápico, pois quando utilizados em altas concentrações podem provocar problemas à saúde, como alterações na pressão arterial, problemas no sistema nervoso central, fígado e rins, podendo levar de acordo com a concentração, em internação ou até a morte. (ANVISA, [2006?]).

Fatores como estes elucidam e evidenciam a necessidade de um conhecimento acerca das plantas medicinais utilizadas, fator esse que pode não existir como demonstra a pesquisa realizada por Arnous (2005), em que a comunidade rural entrevistada, tomou conhecimento das plantas medicinais, na maioria dos casos, com pais e avós, e adquiriram o hábito de plantar em seus jardins ou quintais; ou mesmo os obtêm através dos vizinhos de seus quintais para o preparo do chá.

Dentre as plantas comumente utilizadas em medicina popular, a *M. officinalis* goza de posição de prestígio, como mostra Bett (2013), em seu trabalho realizado com a população do Município de Galvão (Santa Catarina), através de entrevistas com a entrega de formulário. Constatou que a *M. officinalis* é uma das plantas mais utilizadas para o tratamento de ansiedade, com uma porcentagem relativa de 9,1%, dos 121 entrevistados, precedida somente pela *Cymbopogon citratus*, *Citrus*

limettioides e *Matricaria chamomilla*. Nessa pesquisa também analisou as partes das plantas utilizadas: para *M. officinalis*, a população emprega somente as folhas.

Como demonstra Silva (2012), a *M. officinalis* é preparada por infusão, com a utilização das folhas e ramos, para o tratamento de pressão alta, gripe, febre, males do estômago e como calmante, através da sua ingestão pelos moradores de bairros da zona oeste de Cuiabá em Mato Grosso.

2.3 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com Zaroni (2004), as análises microbiológicas realizadas com exemplares de plantas de regiões do estado do Paraná, indicaram que muitas das plantas medicinais destinadas ao consumo humano são impróprias, quando não submetidas a um processo de descontaminação, devido à presença de elevadas contagens de microrganismos aeróbios, leveduras, bolores e de bactérias gram-negativas como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A umidade é um fator que contribui para o desenvolvimento dos processos microbiológicos, portanto, o conhecimento do seu teor é justamente importante para a conservação, armazenamento e manutenção da sua qualidade para a comercialização. (PARK; ANTONIO, 2006). Ela pode estar associada a várias fases do processo de produção do alimento - estocagem, embalagem e processamento - e resulta na diminuição do período de validade. (PARK; ANTONIO, 2006). Sendo assim, as drogas de origem vegetal nem sempre possuem baixa quantidade microbiana devido aos descuidos durante a comercialização, mas isso pode também ocorrer durante as inúmeras etapas de produção. (ZARONI et al., 2004).

Como demonstra Meira ([2010?]), existem outros fatores que alteram o princípio ativo das plantas, como os metabólitos secundários, que podem ser tanto de origem genética, como técnica ou fitotécnica, pois dependem da forma de plantio, adubação, tratos culturais e a época da colheita. Sendo assim, é possível considerar que são vários os fatores que irão interferir na qualidade da planta medicinal. São vários os pontos que precisam ser levados em consideração, desde o seu plantio, adubação e colheita, até o seu processamento e embalagem.

2.4 FALTA DE CONHECIMENTO E CONSEQUENTEMENTE O MAU USO

A utilização das plantas é muito comum, principalmente receitas providas de vizinhos ou parentes sem nenhum conhecimento, que acabam agravando mais ainda a saúde. Como, por exemplo, o uso do suco de carambola em pacientes crônicos renais, que acabam se intoxicando, pois a carambola é rica em potássio, que não é filtrado pelo rim. (RIGOTTI, 2010).

A *Melissa officinalis* também pode causar efeitos adversos como sonolência e hipertensão arterial, seguindo o pressuposto do uso da dosagem erroneamente. (KRAUSE; [2012?]). Assim, como pode acontecer no caso das plantas medicinais, quando utilizada uma dosagem muito baixa, o efeito esperado pode não ser alcançado. (RIGOTTI, 2010). De acordo com esses preceitos, vários projetos foram criados para ensinar a população o uso correto das ervas e oferecer formas terapêuticas e de baixo custo, como “FARMÁCIA VERDE RESGATE DA SABEDORIA POPULAR.” criado através do projeto “A cura pelas plantas” de Marcelo Rigotti em 2010. (RIGOTTI, 2010). A farmácia verde foi criada com o intuito de ensinar à população o conhecimento, identificação, uso e cultivo das plantas medicinais, implementar hortas comunitárias de plantas medicinais e implantar a farmácia de fitoterápicos. (CONSÓRCIO INTERMUNICIPAL DO VALE DO PARANAPANEMA, 2009).

Tanto os fitoterápicos quanto as plantas medicinais possuem riscos de levar a intoxicação ou causar algum outro tipo de reação adversa, quando o seu uso for excessivo. Devido a inúmeros casos de uso incorreto, e também ao crescente número de pessoas adeptas ao uso de alimentos naturais, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de saber o potencial mutagênico das plantas.

2.5 MUTAÇÃO

A mutação nada mais é do que alterações ocasionadas nos nucleotídeos, que estão presentes no material genético de um determinado organismo, e que podem ocorrer tanto na estrutura como no número de cromossomos, sendo assim conhecidas respectivamente como mutações estruturais e numéricas. (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Somente são passadas para a sua prole quando ocorrem em células reprodutivas, caso contrário, quando ocorrem em células somáticas, as

mutações não são transmitidas. (NUSSBAUM et al., 2008; ROBERTIS; HIB, 2001; SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

Como está ligada a uma mudança na sequência de DNA, a mutação também influencia os fenótipos, o comportamento e, principalmente, a fisiologia do organismo, por isso é conhecida como aberrações cromossômicas; enquanto que as mutações gênicas possuem essa denominação devido alterações que ocorrem no genoma, mudando a parte estrutural do gene. (ROBERTIS; HIB, 2001). A capacidade de interação de todo ser vivo e do seu genoma com o ambiente em que está inserido está inscrito dentro do seu DNA, e resulta na modificação que o organismo sofre com o ambiente e o quanto o organismo modifica o ambiente. (ERDTMANN, 2003).

A mutação ocorre de maneira aleatória e cega, quanto ao resultado biológico que causará, pois essas alterações ocorridas no DNA são decorrentes de processos físicos e químicos na estrutura molecular. Cabe, portanto, à natureza, através da seleção natural, determinar as mutações benéficas e eliminar os indivíduos com características inviáveis para a sua sobrevivência. (ERDTMANN, 2003). Porém, é preciso frisar que as mutações sempre ocorrem nas populações, é um processo natural que condiz com o processo evolutivo. Apenas as mutações benéficas acabam se propagando; aquelas que se tornaram maléficas para o indivíduo, muitas vezes ocasionam a sua morte e não são transferidas, pois comprometem a adaptabilidade na natureza. Também podem ocorrer mutações neutras, que não causam efeito nenhum. (USP, 1996). Entretanto, vale ressaltar que na maioria das mutações ocorridas, os resultados são considerados maléficos, pois podem ocasionar malformações, câncer, envelhecimento e por fim, a morte. (ERDTMANN, 2003).

As mutações podem ocorrer devido a dois fatores: por indução ou por espontaneidade. Por conseguinte, são causadas devido ao contato de substâncias químicas, fatores físicos ou radiações, enquanto que as mutações espontâneas, ocorrem geralmente sem causa definida, justamente como o nome já diz, ao acaso, e pode ser devido à perda, adição ou alteração de um nucleotídeo durante a sua replicação. (ROBERTIS; HIB, 2001). O oxigênio também pode servir como um agente mutagênico, quando em altas concentrações, pois forma radicais livre e apenas na medida certa é benéfico. (ERDTMANN, 2003). Não são apenas os agentes ambientais que podem causar a mutação, o material genético está sempre

em perigo de ser alterado, podendo ocorrer devido a erros decorrentes da duplicação. (ROBERTIS; HIB, 2001).

Várias enzimas possuem a função de percorrer o DNA à procura de pares de nucleotídeos incorretos ou danificados. Ao ser identificado, os defeitos são corrigidos por enzimas de reparo de DNA, no qual cada uma possui a capacidade de combater um tipo de dano, em particular. (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Um mecanismo de reparação, é a DNA polimerase, que ao encontrar um nucleotídeo em um lugar erroneamente, regressa e o elimina, e, como resultado, a síntese de DNA continua. (ROBERTIS; HIB, 2001). Outro meio usado é a nuclease reparadora, que retira os primers na síntese contínua e descontínua do DNA, interrompendo a ligação fosfodiéster do nucleotídeo incorreto ao contínuo, sendo completado apenas com a DNA polimerase β , a qual sintetiza o segmento retirado, e a DNA ligase acopla ao DNA contínuo. (ROBERTIS; HIB, 2001).

As mutações induzidas por fatores ambientais são, normalmente, reparadas do mesmo modo que as mutações espontâneas. (ROBERTIS; HIB, 2001). A apoptose, ou seja, morte celular programada, é um fenômeno comum de proteção, presente tanto na vida embrionária como na adulta, e tende a remover células danificadas, desnecessárias, envelhecidas ou como as células tumorais, infectadas ou autorreativas. (ROBERTIS; HIB, 2001).

2.6 TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

O conceito de aberrações diz respeito às mudanças ocorridas na estrutura do cariótipo, devido à movimentação do DNA, diferindo do lugar original. (VILLELA et al., 2003). O teste de aberrações cromossômicas é utilizado para detectar a mutagenicidade, ou seja, a presença de aberrações cromossômicas estruturais, pois verifica mutações ocasionadas quando exposta a um agente mutagênico ou carcinogênico potencial (VILLELA et al., 2003), podendo ocasionar eventos clastogênicos. (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2012). O risco de desenvolver câncer está intimamente ligado com o aparecimento de aberrações cromossômicas. (BONASSI et al., 1995).

O teste realizado *in vitro* possui uma sensibilidade maior do que o realizado *in vivo*, tanto que permite uma percepção melhor sobre o dano que o agente mutagênico causa nas células. (VILLELA et al., 2003). As aberrações

cromossômicas são quantificadas nas metáfases, coradas por Giemsa e oriundas de linfócitos do sangue periférico, devido a sua vida útil relativamente longa, além de transitar por todo o corpo e conservar os danos genéticos recebidos. (SUSPIRO; PRISTA, 2011).

2.7 GENÉTICA TOXICOLÓGICA

A genética toxicológica ou mutagênese é tida como uma área da genética, que investiga os processos responsáveis pelas alterações na estrutura físico-química do DNA. Os mutágenos podem atuar no nível celular ou orgânico, desenvolvendo, respectivamente, a carcinogênese e a teratogênese. Simplificando, a genética toxicológica estuda, de acordo com o âmbito genético, tudo o que desequilibra a vida ou que induz à morte, como organismo ou a nível celular. (ERDTMANN, 2003). O termo teratogênico é empregado para se referir ao efeito genotóxico no crescimento embrionário; enquanto o termo carcinogênese se refere à célula que perde o controle sobre seu ciclo celular e, portanto, se desenvolve de maneira autônoma, gerando o crescimento do tumor. (GUACHALLA; ASCARRUNZ, 2003).

A mudança de apenas um único nucleotídeo na sequência decodificadora pode fazer com que ocorra a perda da expressão gênica ou a formação de um outro produto gênico com as propriedades modificadas, como no caso de uma síntese de outra proteína. (NUSSBAUM et al., 2008; ROBERTIS; HIB, 2001). No caso de uma quebra cromossômica, se ocorrer dentro do gene, pode ocasionar uma perturbação na funcionalidade deste. (GRIFFITHS et al., 2009). As mutações, muitas vezes, podem afetar genes responsáveis pela replicação do DNA, ocasionando, assim, uma proliferação desenfreada das células, com o aparecimento de neoplasias malignas. (GRIFFITHS et al., 2009; ROBERTIS; HIB, 2001). Proto-oncogenes são genes responsáveis pela proliferação e diferenciação, entretanto, caso a proto-oncogenese sofra algum tipo de alteração, pode acabar se tornando uma oncogênese. (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). É importante ressaltar que o organismo possui genes supressores, que servem para corrigir essa falha, ou seja, atuam na regulação quando as oncogenes tendem a se proliferarem. (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

2.8 MUTAÇÕES ESTRUTURAIS

Todo DNA tem a possibilidade de se recombinar, principalmente se estiverem perto, assim se paream e aumentam a chance de ocorrer uma recombinação. Quando ocorre a clastogênese (rompimento dos braços do cromossomo), a ponta que está livre acaba sendo digerida por enzimas de restrição; ou, então, liga-se a uma outra ponta que estiver livre, podendo ocasionar, assim uma recombinação. Esse mesmo princípio é utilizado na transgenia, onde ocorre a incorporação de uma parte do DNA de um corpo estranho em um outro conjunto de material genético. (ERDTMANN, 2003).

Aberrações estruturais podem ser classificadas em: cromossômicas ou cromatídicas, sendo que as alterações cromatídicas são induzidas com maior frequência quando em contato com agentes mutagênicos químicos, do que as cromossômicas. (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2012). Quando se trata de uma aberração cromossômica, esta teve origem durante a fase G1, diferentemente das aberrações cromatídicas, cujos danos são oriundos da fase S/G2 do ciclo celular. (ALBERTINI et al., 2000).

As quebras podem ser divididas em duas concepções; quebras cromossômicas, quando as duas cromátides-irmãs se quebram; e a quebra cromatídica, quando apenas uma das cromátides-irmãs se quebra. (SUSPIRO; PRISTA, 2011).

Os rearranjos são anomalias estruturais, assim como as quebras (cromossômicas/ cromatídicas), mas estes são caracterizados pela ruptura de uma parte do cromossomo, seguido da junção de uma combinação anormal com outros cromossomos. (NUSSBAUM et al., 2008). Como descrito na literatura, os cromossomos dicêntricos são raros, e compostos pela combinação de dois cromossomos diferentes, que se fundem em suas extremidades. (NUSSBAUM et al., 2008). Os cromossomos em anéis se formam devido ao rompimento que ocorre em seus dois braços, na qual é seguida de fusão. (BOROVNIK et al., 2003).

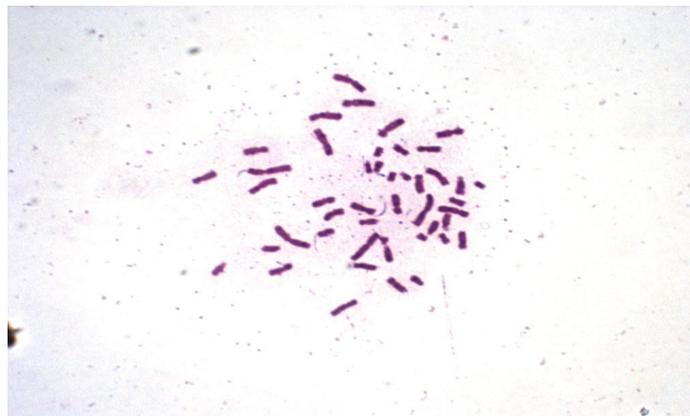
Os gaps são pequenas falhas que ocorrem nos braços dos cromossomos. Podem ocorrer nos dois braços (gap cromossômico) ou em apenas um (gap cromatídico), e não ocorre descontinuidade. (SAVAGE, 1976). Ainda é bem controversa o tema sobre a utilização dos gaps na contagem para a realização de biomonitoramento ambiental, pois o gap é considerado um intervalo, que não possui

uma significância biológica. (PAZ-Y-MIÑO et al., 2002). Porém, sugere-se a contagem de gaps, principalmente quando está relacionado com agentes genotóxicos, que podem aumentar o risco de perda do material genético, além de reorganização gênica e suscetibilidade de ruptura. (PAZ-Y-MIÑO et al., 2002).

Double minutes são descritas na literatura como partículas pequenas de cromatina, sendo considerado uma amplificação da parte extracromossômica, presente em uma variedade de tumores. (THOMAS et al., 2004). A junção de oncogênese com *double minute* acaba sendo letal. Para tanto, é relevante a utilização de métodos para encontrá-los e localizá-los, com o propósito avaliar fármaco que atuem contra *double minute*. Portanto, é de suma importância a eliminação dessa alteração para minimizar a malignidade do tumor. (HAYES; LI, 2014).

Contida na Figura 1, está uma metáfase sem alteração, constituída de 46 cromossomos. O intuito dessa foto é servir de parâmetro para a caracterização das alterações contidas nas Figuras seguintes.

Figura 1 - Metáfase Normal, 46 cromossomos, aumento final de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 2, está contida uma metáfase com 46 cromossomos, sendo que um deles está no formato de anel.

Figura 2 - Cromossomo em anel, aumento final de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 3 contém 46 cromossomos, sendo que apresenta um cromossomo dicêntrico, devido à junção de dois cromossomos pelas extremidades; e um rearranjo complexo, onde dois cromossomos estão se ligando pelas cromátides-irmãs.

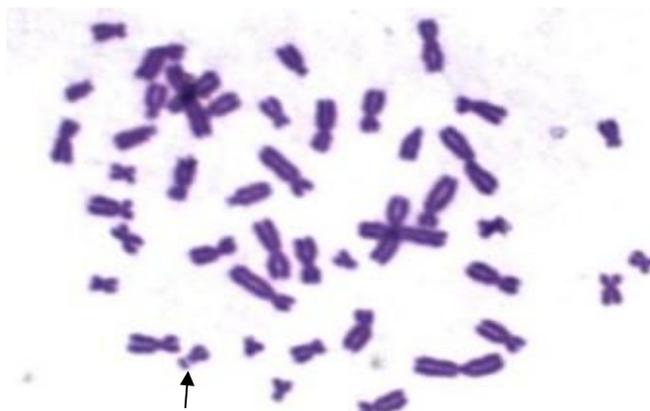
Figura 3 - Cromossomo dicêntrico e rearranjo complexo, aumento de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4 apresenta uma metáfase com 46 cromossomos, sendo que em um cromossomo ocorreu uma quebra cromossômica, ou seja, houve um rompimento nas duas cromátides-irmãs.

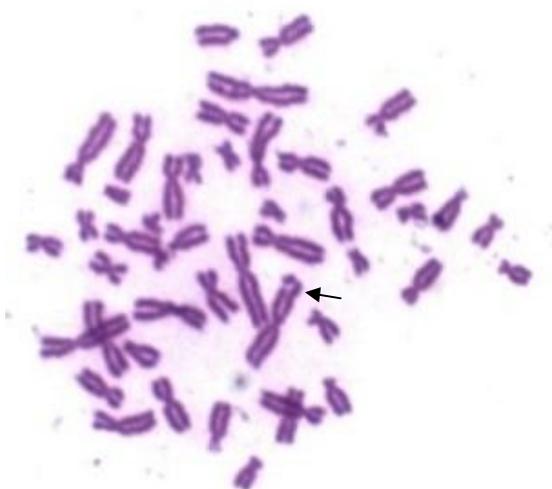
Figura 4 - Quebra cromossômica, aumento de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

A metáfase presente na Figura 5 apresenta 46 cromossomos, onde ocorreu uma quebra cromatídica, referente a uma só cromátide-irmã, no cromossomo indicado pela seta.

Figura 5 - Quebra cromatídica, aumento de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 6, encontra-se uma metáfase com 46 cromossomos, com a reorganização de três cromossomos em um rearranjo complexo.

Figura 6 - Rearranjo complexo, aumento de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

A metáfase apresentada na Figura 7, com 46 cromossomos, apresenta um double minute, amplificação da parte extracromossômica.

Figura 7 - *Double minute*, aumento final de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora

2.9 ANTIGENOTOXIDADE E *Melissa officinalis*

De acordo com Carvalho et al. (2011), o extrato de *M. officinalis* foi eficiente e evitou a indução de alterações no DNA pelo agente indutor de dano, metilmetanosulfonato. Em outras palavras, nesse estudo com ratos, o resultado indicou ação antimutagênica e antigenotóxica.

O ácido rosmarínico não tem ação genotóxica, pelo contrário, é capaz de reduzir os danos causados no DNA, quando induzidos pelo etanol, no cérebro e em células periféricas de acordo com estudos realizados em camundongos. (OLIVEIRA et al., 2012).

Kamdem e colaboradores (2013) também constataram que o extrato etanólico obtido pelas folhas da *M. officinalis* não possui ação genotóxica e nem citotóxica para os leucócitos humanos. (KAMDEM et al., 2013).

Segundo Queiroz (2013), através do teste de aberração cromossômica, o extrato aquoso da *M. officinalis* não apresentou efeito clastogênico, assim como apresentou um percentual de 100% de metáfases integras e ausência de citotoxicidade através do método de exclusão de Trypan, indicando uma viabilidade celular maior que 97%. O extrato aquoso da *Melissa officinalis*, em cultura de linfócitos humanos, foi desenvolvido simultaneamente como o extrato metanólico e etanólico, estudados nesse projeto, ou seja, a *M. Officinalis* empregada possui a mesma origem.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente é comum o uso em larga escala de compostos naturais, como forma de medicina popular e alternativa, todavia este consumo é normalmente feito de maneira inconsequente e esta falta de conhecimento acerca do mesmo é preocupante.

Muitos destes compostos podem vir a apresentar efeitos colaterais, algumas vezes graves, como problemas vasculares, renais e, em alguns casos, inclusive, danos ao DNA. Desta forma, é possível perceber a carência de estudos que busquem descobrir possíveis efeitos negativos dos mesmos.

Um destes produtos é a *Melissa officinalis*, mundialmente utilizada como planta medicinal, através de chás e infusões; extração de seus óleos essenciais para indústrias cosméticas; como fitoterápicos e também nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Consequentemente, é vital a realização de estudos para comprovar não apenas sua eficácia e efetividade, como também possíveis danos causados por ela, assegurando assim a segurança e saúde da população.

Desta forma, esse trabalho tem como principal finalidade verificar se o uso da *Melissa officinalis* pode causar algum dano no DNA ou se possui alguma ação protetora quando exposta a um agente indutor de dano, no caso, o metilmetanosulfonato (MMS), além de classificar os tipos de alterações, quando encontradas.

4 OBJETIVOS

Apresenta-se nos tópicos abaixo o objetivo geral e os objetivos específicos da pesquisa.

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar as atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcoólicos de *Melissa officinalis*, *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) investigar a indução de aberrações cromossômicas, pelos tratamentos com extratos metanólico e etanólico de *Melissa officinalis*, em cultura de linfócitos humanos;
- b) averiguar o efeito anticlastogênico dos tratamentos com extratos metanólico e etanólico de *Melissa officinalis*, perante a indução de danos por metilmetanosulfonato, em cultura de linfócitos humanos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

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 a realização do trabalho, foram coletadas amostras de sangue periférico de 6 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.

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Melissa officinalis* (partes aéreas) foi obtido do Laboratório Panizza Ltda (CNPJ: 01.807.328/0001-87), onde as plantas são mantidas em ambiente climatizado, com rígido controle de qualidade, conforme determinado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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.

5.2 CULTURA CELULAR

A cultura de linfócitos foi obtida a partir de sangue total de 6 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 e os experimentos foram realizados entre 2013 e 2014. 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 Heps (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), foi adicionado

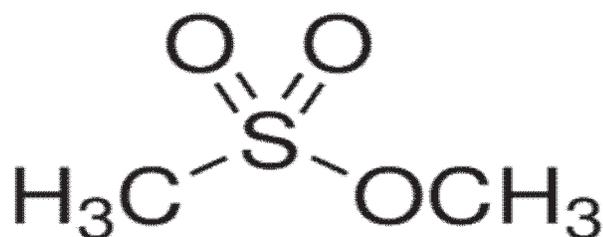
aproximadamente 0,5 mL de sangue periférico, o qual foi incubado a 37°C em estufa (502 FANEM – São Paulo – Brasil), por 48 horas. Após esse período, os tratamentos de mutagenicidade e antimutagenicidade foram realizados.

5.3 AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA

No presente trabalho, para indução de danos no DNA foi utilizado o agente alquilante, de ação direta Metilmetanosulfonato – MMS (CAS: 66-27-3, SIGMA-ALDRICH, USA), 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 Ca²⁺ e Mg²⁺, pH 7,4, estéril. A concentração final em cultura, estabelecida em testes pilotos, a 1 µg/mL.

Metilmetanosulfonato (Figura 8) vem sendo utilizado há várias décadas como um agente indutor de dano do DNA, com o intuito de constatar as vias de reparação deste, em respostas aos danos, além da mutagenicidade ocasionada. (WYATT; PITTMAN, 2006). Segundo Aslanian, Yates III e Hunter (2014), o metilmetanosulfonato ao induzir dano ao DNA, afeta os pontos de checagem referentes aos processos do ciclo celular. É essencial a utilização de um grupo de controle positivo para os estudos dentro das áreas de genética toxicológica, tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro*, com o propósito de obter um critério padrão e comparação de dados. (KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000).

Figura 8 - Estrutura Molecular Metilmetanosulfonato.
Fórmula linear CH₃SO₃CH₃



Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

5.4 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram realizados simultaneamente por 24h.

- a. Controle Negativo - (30 μ L de DMSO);
- b. Controle Positivo - Agente Indutor de Dano (1 μ g/mL de MMS);
- c. Extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 μ g/mL);
- d. Extrato metanólico de *Melissa officinalis* (100 μ g/mL);
- e. Extrato etanólico de *Melissa officinalis* + MMS (100 μ g/mL + 1 μ g/mL de MMS);
- f. Extrato metanólico de *Melissa officinalis* + MMS (100 μ g/mL + 1 μ g/mL de MMS).

5.5 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 considerado válido quando a viabilidade celular foi superior que 50%.

5.6 TESTE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Uma hora e trinta minutos antes de completar às 72 horas de incubação, foi aplicado 100 μ L 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. As amostras foram armazenadas a 4°C até o momento na montagem das lâminas por gotejamento. A análise foi realizada em microscópio de luz, contando 100 metáfases por

tratamento/voluntário, analisando o número e a integridade cromossômica.

5.7 ÍNDICE MITÓTICO

Para análise do índice mitótico (IM), foram contadas 1000 células em microscópio de luz com aumento de 400x, diferenciando células em intérfase de células em metáfase. O IM foi obtido através da equação:

$$IM = m/T \times 100 \quad (1)$$

Sendo que:

m = número de células em metáfase

T = número total de células (metáfases + intérfases)

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística descritiva dos dados e as comparações entre os grupos que foram realizadas por *t-Student*, seguindo critérios de normalidade. (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

6 RESULTADOS

Através dos resultados obtidos pelo método de exclusão de azul Trypan, foi possível constatar que a viabilidade celular foi superior a 99%, tanto no extrato metanólico como no extrato etanólico de *Melissa officinalis*, indicando desse modo, a ausência de atividade citotóxica em ambos os extratos alcoólicos, em cultura de linfócito humano (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação da viabilidade celular dos extratos metanólico e etanólico de *Melissa officinalis*, Stapf (100 µg/mL) em linfócitos humanos, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan

Tratamentos	Viabilidade Celular
	Média ±DP
Controle Positivo (MMS)	100,000 ± 0,000 ^{ns}
Controle Negativo (DMSO)	99,980 ± 0,027 ^{ns}
Clastogenicidade	
EM <i>M. officinalis</i>	99,990 ± 0,014 ^{ns}
EE <i>M. officinalis</i>	99,998 ± 0,004 ^{ns}
Anticlastogenicidade	
EM <i>M. officinalis</i>	99,986 ± 0,018 ^{ns}
EE <i>M. officinalis</i>	99,957 ± 0,029

Legenda: MMS, metilmetanosulfonato (1 µg/mL); DMSO, dimetilsufóxido (30 µL); EM, extrato metanólico (100µg/mL); EE, extrato etanólico (100µg/mL); DP, desvio-padrão; ns Teste t-Student pareado, bicaudal, não significativo, (p>0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

O índice mitótico apresentou uma variação de 21,15 ± 12,33 (média ± desvio padrão) no controle positivo; e 10,18 ± 6,00 no extrato metanólico de *Melissa officinalis*. Esse baixo índice de metáfases pode ter ocorrido devido à formação de coágulos no tubo de cultura do extrato metanólico, dificultando, assim, o número de células/metáfases na lâmina. Entretanto, esse fato não foi devido aos efeitos do tratamento justamente por não ter apresentado uma diferença significativa (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação de clastogenicidade e anticlastogenicidade de extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis* (100 µg/mL) em cultura de linfócitos humanos

Tratamentos	Índice Mitótico (%)	Células com aberração cromossômica	Tipos de Aberrações Cromossômicas
	Média ± DP	Média ± DP	
Controle Positivo (MMS)	21,15 ± 12,33	6,17 ± 1,33 b	QCM, QCT, RC, DM, DC
Controle Negativo (DMSO)	17,82 ± 9,68	1,00 ± 1,33 a	QCM, QCT, RC
Clastogenicidade			
EM M. officinalis	10,18 ± 6,00	4,67 ± 3,11b	QCM, QCT, RC, DM, DC
EE M. officinalis	17,6 ± 10,83	4,17 ± 2,89 a	QCM, QCT, RC, Anel
Anticlastogenicidade			
EM M. officinalis + MMS	11,53 ± 5,95	7,50 ± 5,50 b	QCM, QCT, RC, DM
EE M. officinalis + MMS	18,02 ± 10,45	3,67 ± 3,89 b	QCM, QCT, RC, DM

Legenda: MMS, metilmetanosulfonato (1 µg/mL); DMSO, dimetilsulfóxido (30 µL); EM, extrato metanólico (100µg/mL); EE, extrato etanólico (100µg/mL); DP, desvio-padrão; a, b Teste t-Student pareado, unicaudal, tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa (p>0,05); tratamentos seguidos de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p<0,05). QCM, quebra cromossômica; QCT, quebra cromatídica; RC, rearranjo complexo; DM, *double minute*; DC, cromossomo dicêntrico; Anel, cromossomo em anel.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do teste t-Student (pareado e bicaudal), foram obtidos dados acerca da significância do controle positivo vs controle negativo; controle negativo vs clastogenicidade; e, controle positivo vs anticlastogenicidade. A avaliação da clastogenicidade dos extratos alcoólicos de *Melissa officinalis* foi realizada em cultura de linfócito humano, sendo que a adição do agente indutor de danos MMS, em um dos tratamentos, foi realizada para a obtenção da anticlastogenicidade. Quando comparado o controle negativo com o tratamento realizado pelo extrato etanólico de *M. officinalis*, este não apresentou clastogenicidade, enquanto que o extrato metanólico de *M. officinalis*, ao ser comparado com o controle negativo, apresentou diferença significativa ($p=0,04$), indicando, assim, um potencial danoso ao DNA. Comparando o controle positivo com o tratamento realizado pelos extratos alcoólicos de *M. officinalis* associados ao MMS, não apresentou potencial anticlastogênico, devido ao teste t-Student não apresentar significância, ou seja, $p>0,05$.

Também se mostrou significativo o resultado da comparação do controle positivo com o controle negativo ($p=0,0028$) na qual o controle positivo apresentou (média \pm desvio padrão) $6,17\pm 1,33$, e o controle negativo ($1,00\pm 1,33$), indicando que os tratamentos com o metilmetanosulfonato foram eficazes. Portanto, é possível concluir que o extrato etanólico não possui ação danosa para o DNA, assim como também não apresenta ação protetora contra o agente indutor de dano metilmetanosulfonato, ou seja, não são clastogênicos e nem anticlastogênicos. Sendo classificado como clastogênico apenas o extrato metanólico da *M. officinalis*, sem ação anticlastogênica.

7 DISCUSSÃO

Atualmente, muitos tipos de testes são disponibilizados aos profissionais com o intuito de avaliar os efeitos carcinogênicos e genotóxicos, podendo ser referente ao um organismo, microorganismo, plantas, entre outros. (FONSECA; PEREIRA, 2004). Cabe então ao pesquisador decidir o protocolo que mais se adéqua ao seu trabalho.

Dentre estes testes, pelo ensaio cometa é possível determinar a genotoxicidade e antigenotoxicidade de um determinado produto e a avaliação de mutagenicidade geralmente é realizada através do micronúcleo. (ANGELONI, 2010) ou teste de aberração cromossômica. Enquanto que a avaliação da citotoxicidade é realizada através do método de exclusão de Trypan, que consiste basicamente na coloração das células, diferenciando dessa forma, as células vivas das células mortas, sendo que apenas as células mortas acabam se corando, pois as vivas possuem um sistema de seletividade que não permite a entrada do corante na membrana plasmática. Outros tipos de testes também são empregados para determinar a viabilidade celular, como o teste por contato direto, caracterizado pela redução de tetrazolium MTT na mitocôndria. (PALMA, 2007); teste por difusão em ágar, onde ocorre a formação de um halo claro – devido lise ou morte celular - na placa de petri, sendo determinado seu potencial citotóxico devido a medida do diâmetro do halo; e, o método de incorporação do vermelho neutro, devido a captação do corante em células vivas, no meio de cultura. Assim como a verificação da citotoxicidade, pode ser considerada, qualitativa, na qual é realizado um exame microscópio para determinar mudanças na morfologia das células; e, quantitativa, determinada pelo número de células, quantidade de colônias celulares, proteínas, entre outros fatores. (ROGERO et al., 2003).

Desta forma, alterações significativas no cromossomo podem gerar problemas celulares, e a longo prazo podem causar entre outras doenças, tumores. Por esta razão, para tal trabalho foi utilizado o teste de aberração cromossômica, com o intuito de desta forma descobrir o potencial clastogênico e anticlastogênico dos extratos da *M. officinalis*, além das mutações estruturais ocasionadas, em cultura de linfócitos humanos, devido a sua vida útil ser relativamente longa e preservar os danos recebidos no material genético.

São inúmeros os trabalhos acerca das substâncias extraídas da *Melissa*

officinalis, indicando sua ação carminativa, anticolérica, ansiolítica, hipotensora, além de apresentar potencial antiviral, antitumoral, antiestresse e capacidade sedativa, como descrito em trabalhos mais recentes. Contudo, ainda são poucos os trabalhos que relacionam a *Melissa officinalis* com a indução ou inibição de danos no DNA.

Apesar de encontrados trabalhos sobre a mutagenicidade e antimutagenicidade da *Melissa officinalis*, em nenhum deles foi utilizado o teste de aberração cromossômica, tornando difícil, então, a sua comparação. Entretanto, para a elaboração desta discussão, trabalhos relacionados com a *Melissa officinalis* foram utilizados, sendo a maioria com elaboração de seu potencial genotóxico e antigenotóxico.

Angeloni (2010) realizou testes *in vivo*, na qual a genotoxicidade e mutagenicidade não foram apresentadas, enquanto que o extrato etanólico de *M. officinalis* apresentou um efeito antigenotóxico (250mg/kg) e de maneira mais branda, apresentando ação antimutagênica (500mg/kg), através do ensaio cometa em medula óssea de camundongos.

De acordo com Carvalho (2009), foram atribuídas ações parciais antigenotóxicas - concentração de 250mg/kg e 500mg/kg - do extrato hidroalcoólico de *M. officinalis* utilizados em camundongos, apresentando diferenças significativas ao compararem os ratos tratados com o extrato de *Melissa officinalis* + MMS dos que foram tratados com solução salina + MMS, ocasionando assim uma diminuição dos danos causados diretamente ao DNA das células do sangue periférico dos animais, indicados pela ação não genotóxica referente ao teste do cometa. Através da triagem fitoquímica da *M. officinalis*, foram observados compostos fenólicos, ácido caféico e ácido rosmarínico, taninos, citrais, flavonóides, alcalóides e cumarinas. Tanto o composto fenólico como o tanino, flavonoide, ácido caféico e ácido rosmarínico, possuem capacidade oxidante, sendo capazes de atuar na supressão da mutagenicidade e clastogenicidade, ao impedir a produção de radicais livre.

O extrato etanólico de *M. officinalis* apresentou ação antimutagênica e antigenotóxica em experimentos realizados em camundongos machos – quando em doses elevadas (250mg/kg e 500mg/Kg) - evitando a indução de danos no DNA após a exposição ao metilmetanosulfonato. Enquanto que o extrato aquoso, realizado através da infusão em água quente da *M. officinalis*, não se mostrou eficaz em nenhum dos tratamentos. (CARVALHO, 2011).

Na presente pesquisa, realizada com o teste de aberração cromossômica, *Melissa officinalis* não apresentou nem ação clastogênica nem anticlastogênica, no extrato etanólico, como descritos em outros trabalhos pesquisados. A concentração de extrato etanólico de *M. officinalis* utilizado diferiu dos trabalhos comparados. A anticlastogênicidade pode não ter sido ocasionada, devido à baixa concentração do extrato (100 µg/mL), enquanto que os extratos antimutagênicos somente apresentaram essa ação, em uma concentração mais alta - 500mg/Kg.

Outra possível explicação para tal discrepância em relação ao efeito anticlastogênico, foi que no presente trabalho, foram utilizadas culturas de linfócitos humanos, sendo uma cultura *in vitro*, diferentemente dos realizados *in vivo*, utilizando ratos e camundongos. O organismo dos ratos podem apresentar algumas diferenças, quando comparado com o organismo humano, possibilitando assim um resultado diferente. Além do fato, de serem pesquisas *in vivo*, com a exposição do metilmetanosulfonato ao rato *vivo*, induzindo talvez uma reação de defesa do organismo a essa indução de dano e até mesmo a metabolização dos extratos, gerando resultados diferenciados.

Tal qual na pesquisa desenvolvida em outros projetos, *double minutes* foram encontrados em quase todos os tratamentos, menos no extrato etanólico e no controle negativo. No entanto, sempre em incidência pequena. Uma explicação encontrada, foi que durante o processo de mitose, é possível ser passados para as células-filhas, justamente por estarem ligados aos cromossomos; mas a maioria das vezes, os *double minutes* são perdidos e acabam dando origem aos micronúcleos. (MERGENER; LUDWING; MALUF, 2011). Além disso, outra hipótese levantada, é que o extrato metanólico por ser clastogênico, induza o aparecimento de alterações, assim como os *double minutes*, presentes em vários tumores. O aparecimento de *double minute* no extrato etanólico, pode estar ligado ao uso do MMS, indutor de dano, com potencial cancerígeno, devido à ausência de anticlastogênicidade. O encontro de *double minute* também ocorreu no controle positivo, porém não foi encontrado no controle negativo, mostrando que a planta em si não possui atividade clastogênica.

Como o esperado, este trabalho corroborou com os outros analisados, indicando que o extrato etanólico da *Melissa officinalis* não apresenta ação mutagênica, confirmando, assim sua segurança para o consumo humano. Apenas o extrato metanólico se apresentou tóxico para os linfócitos humanos.

A toxicidade do metanol é amplamente explorada, porém ainda são escassos estudos sobre como a toxicidade afeta o desenvolvimento. A metabolização é diferente entre humanos e roedores, sendo que o organismo humano transforma o MeOH (metanol) em formaldeído, sendo logo em seguida convertido em ácido fórmico – altamente tóxico- para depois ser convertido em metabólicos não tóxicos de dióxido de carbono; enquanto que os roedores dependem de uma atividade peroxidativa da enzima catalase, o que explica o fato dos roedores não apresentarem os mesmos sintomas que o ser humano devido a toxicidade de MeOH. (SIU et al., 2013). Sabe-se também que o MeOH possui ação tóxica para os seres humanos, em concentrações acima de 10 mg/L no sangue. (CLARY, 2003). Segundo Parthasarathy et al. (2006), o metal afeta os sistemas imunitários, apresentando uma intoxicação em subconjuntos de linfócitos esplênicos, assim como células de MHC classe II, macrófagos e citocinas, em um estudo experimental com ratos. O extrato metanólico da semente de araticum (*Annona coriacea*) (SILVA; PEREIRA; BENTO, 2007), assim como o extrato metanólico da amêndoa da semente de nim. (TRINDADE et al., 2000) se mostraram tóxicas para as lagartas (*T. absoluta*).

Apesar de não ter sido encontrada propriedade antigenotóxica, a *Melissa officinalis* possui diversas outras propriedades benéficas à saúde humana, como ação antitumoral, onde apesar dos componentes responsáveis não serem identificados, a sua ação antitumoral foi comprovada através dos estudos *in vitro*, com cultura de células de câncer de mama humano e *in vivo*, com a utilização de ratos Wistar. (SARAYDIN et al., 2012).

A *Melissa officinalis* também apresenta resultados positivos para o tratamento de doenças degenerativas devido à sua ação neuroprotetora, por sua capacidade de proteger o sistema nervoso contra o processo de apoptose quando induzida pelo ecstasy. (HASSANZADEH et al., 2010). A descoberta da capacidade neuroprotetora de *Melissa officinalis* é um grande passo para o tratamento de doenças degenerativas, sendo de total importância a descoberta do componente responsável por essa defesa, para tanto, é recomendado o desenvolvimento de mais pesquisas a respeito desse assunto. Em pesquisas referentes ao Alzheimer, houve uma diferença significativa entre os pacientes tratados durante 16 semanas com *Melissa officinalis*, isto é, em caso de Alzheimer leve e moderado. (AKHONDZADEH et al.,

2003). Esta pesquisa analisou os benefícios causados pela *Melissa officinalis* quando interage com células do sistema nervoso, que se provou capaz de modular o humor, demonstrando a sua capacidade sedativa.

É possível estipular que a *Melissa officinalis* pode apresentar diferentes resultados, dependendo apenas do foco do estudo, ou seja, diferentes tecidos do corpo, assim como a capacidade de interação deste com as substâncias produzidas pela *Melissa officinalis*.

Devido à vasta possibilidade de emprego terapêutico da *M. officinalis*, é de suma importância a realização de pesquisas que investiguem seu potencial mutagênico e antimutagênico, a fim de assegurar seu uso pela população.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em conta a estrondosa quantidade de desinformação encontrada na população acerca do uso de plantas medicinais, que pode não só tornar o tratamento com estes compostos inúteis, como também comprometer, em alguns casos seriamente, a saúde do indivíduo. Fica evidente a necessidade não só de conscientização da população sobre a forma correta de utilização das mesmas, como também de estudos que verifiquem a real eficácia destas, além claro, de possíveis danos colaterais.

Pesquisas sobre os efeitos provocados pelas plantas medicinais também são de suma importância, para avaliar os riscos que a população está sujeita, assim como também avaliar os efeitos positivos que estas podem proporcionar para a saúde humana. Um dos possíveis danos colaterais gerados são os causados ao DNA, podendo ocasionar mutações que conseqüentemente podem futuramente progredir para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Este talvez seja um dos efeitos colaterais mais perigosos possíveis, uma vez que, ao contrário dos outros que são percebidos poucos momentos após a ingestão das plantas, estes permanecem ocultos, se agravando a cada utilização de tais compostos.

Dentre estes compostos, a *Melissa officinalis* se destaca pela sua ampla utilização para o tratamento das mais variadas enfermidades, sendo encontrada na cultura popular dos mais variados lugares e grupos. Diante disso, foram realizados testes acerca da real eficiência anticlastogênica, e se a mesma poderia de alguma forma desempenhar o papel inverso, podendo possuir ação de clastogenicidade. O presente estudo concluiu, com base em testes de aberração cromossômica em linfócitos humanos, que o extrato etanólico de *Melissa officinalis* não apresenta ação clastogênica ao consumo humano, podendo por conseqüente ser ingerida sem apresentar danos no DNA humano. O extrato metanólico da *M. officinalis*, por sua vez, se mostrou clastogênico, ao induzir danos no material genético. Em contrapartida, também não averiguou potencial anticlastogênico, no extrato etanólico indicando que a mesma não apresenta vantagens na prevenção de danos genéticos em seres humanos.

REFERÊNCIAS

AKHONDZADEH, S. et al. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, v. 74, n. 7, p. 863–866, jul. 2003. Disponível em: <<http://jnnp.bmj.com/content/74/7/863.full>>. Acesso em: 10 out. 2015.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111-172, aug. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574200000491>>. Acesso em: 07 ago. 2015.

ANGELONI, M. J. F. C. **Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Melissa officinalis***. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul, Criciúma, 2010.

ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Fitoterápicos. **ANVISA**, [2006?]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 02 abr. 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**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.uel.br/ccs/espacoparasaude/v6n2/plantamedicinal.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ASLANIAN, A.; YATES III, J. R. B.; HUNTER. T. Mass spectrometry-based quantification of the cellular response to methyl methanesulfonate treatment in human cells. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 15, n. 29, p. 29-38, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786413003042>>. Acesso em: 11 out. 2015.

BETT, M. S. **O uso popular de plantas medicinais utilizadas no tratamento da ansiedade no município de Galvão - SC**. 2013. 63 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <<https://ead.ufsc.br/biologia/files/2014/05/Marisa-Szczepanski-Bett.pdf>>. Acesso em: 06 maio 2015.

BONASSI, S. et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in human? Preliminary results of an Italian cohort study. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, New York, v. 79, n. 2, p. 133-135, feb. 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0165-4608\(94\)00131-T](http://dx.doi.org/10.1016/0165-4608(94)00131-T)>. Acesso em: 07 set. 2015.

BOROVNIK, C. L. et al. Caracterização de um cromossomo 22 em anel por citogenética molecular. **Einstein**, São Paulo, v. 1, p. 113-6, 2003. Disponível em:

<<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Caracterizacao%20de%20um%20cromossomo%20traduzidos.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2015.

CARVALHO, N. C. **Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Melissa officinalis***. 2009. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade do Extremo Sul, Criciúma, 2009.

CARVALHO, N. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 290-297, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3115325/pdf/gmb-34-2-290.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2015.

COLUSSI, T. C. et al. *Melissa officinalis* L. Características gerais e biossíntese dos principais metabólitos secundários. **Revista de Biologia e Farmacologia**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 89-100, 2011. Disponível em: <http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v5n2-2011/MELISSA_OFFICINALIS_L.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

CONSÓRCIO INTERMUNICIPAL DO VALE DO PARANAPANEMA - CIVAP. Farmácia verde. **CIVAP**, 2009. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.civap.com.br%2Fsite%2Fuploads%2Fprojetos%2F%3Fpdf%3D764_202_497_arquivo.pdf&ei=enFZVab5NsGhgwS28ICwDA&usg=A FQjCNHhw9l89hm6loa6nXFctMnVIV6i1w>. Acesso em: 08 mar. 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. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp100607.pdf>>. Acesso em: 30 fev. 2015.

DUARTE, R.; MOMESSO, L. S. Análise do perfil de óleos essenciais de *Melissa officinalis* (*Lamiaceae*). **Fio.edu**, [2009?]. Disponível em: <http://fio.edu.br/cic/anais/2009_viii_cic/Artigos/10/10.01.pdf>. Acesso em: 06 maio 2015.

ERDTMANN. Genética toxicológica. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, Goiás, v. 16, n. 7-8, p. 51-54, 2004. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/79/16-aplicacao.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, London, v. 50, n. 5, p. 477-480, nov. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2004.01.012>>. Acesso em: 03 out. 2015.

GEUENICH, S. et al. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density.

Retrovirology, London, v. 5, n. 27, p.1-16, mar. 2008. Disponível em; <<http://www.retrovirology.com/content/5/1/27>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GUACHALLA, L.; ASCARRUNZL, M. E. La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo. **Biofarbo**, Bolivia, v. 11, p. 75-82, dic. 2003. Disponível em: <<http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20031114.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2015.

HASSANZADEH, G. et al. Neuroprotective properties of melissa officinalis l. extract against ecstasy-induced neurotoxicity. **Cell Journal**, Tehran, v. 13, n. 1, p. 25-30, apr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3652537/>>. Acesso em: 11 set. 2015.

HAYES, M.; LI, J. An integrative framework for the identification of double minute chromosomes using next generation sequencing data. **BMC Genetics**, London, v. 16, n. 2, p. 2-7, apr. 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/16/S2/S1>>. Acesso em: 01 set. 2015.

KAMDEM, J. P. et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 51, p. 26-34, nov. 2013. Disponível em; <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013004731>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

KENNEDY, D. O.; LITTLE, W.; SCHOLEY, A. B. Attenuation of Laboratory-Induced Stress in Humans After Acute Administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). **Psychosomatic Medicine**, Baltimore, v. 66, n. 4, p. 607-613, aug. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272110>>. Acesso em: 17 maio 2015.

KRAUSE, E. H. L. *Melissa*. **Londrina**, [2012?]. Disponível em: <http://www.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec_saude/fitoterapia/publicacoes/melissa2.pdf>. Acesso em: 04 maio de 2015.

KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation Research**, Netherlands, v. 453, n. 1, p. 45-50, sep. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510700000749>>. Acesso em: 10 set. 2015.

MANHOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -carotene reduces sister chromatid exchange induced chemical carcinogens in mouse mamary cells in organ culture. **Cell Biology International Report**, Chichester, v. 9, n. 9, p. 783-789, sep. 1985.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0309165185900967>>. Acesso em:

17 nov. 2015.

MARONGIU, B. et al. Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 18, n. 10, p. 789-792, oct. 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1549/abstract;jsessionid=E9D9036B8D71E1CDD5EDAB5B3CA0DCDF.f04t01>>. Acesso em: 17 out. 2015.

MASCOTTI, K.; McCullough, J.; Burger, S. R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. **Transfusion**, Arlington, v. 40, n. 6, p. 693-696, jun. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x/abstract;jsessionid=D00E7958C3CA91B6BCA7E17368502339.f04t01>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

MEIRA, M. R.; SOUZA, S. A. M.; MARTINS, E. R. Plantas medicinais, produção e cultivo da *Melissa officinalis* no Brasil. **Conhecer**, [2010?]. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/plantas.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v11n1/a04v11n1>>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

MERGENER, R.; LUDWING, L. B.; MALUF, S. W. Alterações cromossômicas estruturais. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M.; **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artemed, 2011. p. 80-102.

METHYLMETHANESULFONATE. **Sigma-Aldrich**, 2005. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m4016?lang=pt®ion=br>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

MÜZELL, D. P. **Propriedades biológicas de extratos de *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) em ratos Wistar**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NUSSBAUM, R. L. et al. **Thompson & Thompson**: genética médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA, N. C. D. et al. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1208-1214, may. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512000555>>. Acesso em: 01 set. 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD guideline for the testing of chemicals: proposal for updating test guideline 473. **OECD**, 2012. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG473%20Oct2012%20updated%2029oct.pdf>>

>. Acesso em: 03 fev. 2015.

PALMA, M. B. **Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)**. 2007. 41f. Relatório final de projeto de iniciação científica – UNIVP, 2007.

PAZ-Y-MIÑO, C. et al. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 516, n. 1-2, p. 57–61, apr. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571802000219>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. Análises de materiais biológicos. **Feagri**, 2006. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf>. Acesso em: 30 fev. 2015.

PEREIRA, P. et al. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacological Research**, London, v. 52, n. 3, p. 199-203, sep. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661805000708>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

QUEIROZ, T. B. **Análises físico-químicas de *Lippia alba* e *Melissa officinalis* e avaliação de clastogenicidade de seus extratos aquosos em leucócitos humanos**. 2013. 39 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2013.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. 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, jun. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86212009000200021&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 mar. 2015.

RIBEIRO, L. R.; SALVADOR, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

RIGOTTI, M. Farmácia verde resgate da sabedoria popular: a cura pelas plantas. **Scribd**, 2010. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/34290656/Projeto-Farmacia-Verde-Resgate-da-Sabedoria-Popular#scribd>>. Acesso em: 03 mar. 2015.

ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDAB, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300003>. Acesso em: 07 dez. 2015.

SARAYDIN, S. U. et al. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast cancer *in*

vitro and *in vivo*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 13, n. 6, p. 2765-2770, 2012. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume13_No6/2765-70%205.19%20Serpil%20Saraydin.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2015.

SAVAGE, J. R. K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 13, n. 2, p. 103-122, apr. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1013369/?page=1>>. Acesso em 20 abr. 2015.

SOCIEDADE ESPANHOLA DE EVOLUÇÃO BIOLÓGICA. MUTAÇÕES. **USP**, 1996. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC1Mutationsp2.shtml>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

SILVA, J. S.; NETO, G.G. O uso de recursos vegetais com fins medicinais por moradores de bairros da zona oeste de Cuiabá – MT, Brasil. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 10, n. 1, p. 9-22, maio 2012. Disponível em: <http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol10/ARTIGO_2_RCAA_v10n1a2012.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

SILVA, A. P. T.; PEREIRA, M. J. B.; BENTO, L. F. Extrato metanólico da semente de araticum (*Annona coriacea*) (Mart.) sobre a mortalidade da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Mato Grosso, v. 2, n. 2, p. 1150-1153, out. 2007.

SILVA, P. A.; SOUZA, L. B. G.; CORTEZ, L. E. R. Análise microbiológica de amostras secas de camomila comercializadas na cidade de maringá - PR. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. **Resumos...** Maringá: UNICESUMAR, 2009. Disponível em: <http://www.unicesumar.edu.br/epcc2009/anais/priscila_aparecida_silva.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2015.

SILVA, S. et al. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* Produced under the Influence of Growth Regulators. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1387-1390, nov./dec. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532005000800014&script=sci_arttext>. Acesso em: 02 abr. 2015.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SUSPIRO, A.; PRISTA, J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: A minireview. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 207, n. 1, p. 42-52, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427411015098>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

THOMAS, L. et al. *Double minute* chromosomes in monoblastic (m5) and myeloblastic (m2) acute myeloid leukemia: two case reports and a review of literature. **American Journal of Hematology**, New York, v. 77, n. 1, p. 55-61, sep.

2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.20151/abstract>>. Acesso em: 07 nov. 2015.

TRINDADE, R. C. P. et al. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 407-413, jul./set. 2000.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds.

Mutation Research,

Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 57-85, jan. 1990. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016511109090039E>>. Acesso em: 17 maio 2015.

WU, X.; ZHENG, Y.; HSU, T. C. Mutagen induced chromatid breakage as a marker of cancer risk. In: KEOHAVONG, P.; GRANT, S. P. **Molecular Toxicology**

Protocols. New Jersey: Humana Press, 2005. p. 59-67. Disponível em:

<<https://books.google.com.br/booksid=sCzZtXtvHRsC&pg=PA66&lpg=PA66&dq=Wu,+Zheng+e+Hsu&source=bl&ots=TH4t5XZ3X&sig=NKbxkSSppITGHKU8cAYVkt8cJ0k&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwjNs4Ho8qXJAhVC1B4KHbmOD9gQ6AEIHjAA#v=onepage&q=aberration%20&f=false>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. **Chemical Research in Toxicology**,

Washington, v. 19, n. 12, p. 1580-1594, dec. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2542901/>>. Acesso em: 17 out. 2015.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 14, n. 1, p.

29-39, fev. 2004. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v14n1/a05v14n1.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

ZELNICK, R. D. et al. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from *Coleus barbatus* Benth. **Tetrahedron**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1457-1467, 1977.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402077880058>>. Acesso em 20 abr. 2015.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - Nº. 382.227

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORACÃO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANTI-/CLASTOGENICIDADE DE DUAS ESPÉCIES DE ERVA-CIDREIRA: LIPPIA ALBA E MELISSA OFFICINALIS

Pesquisador: Marilanda Ferreira Bellini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17379413.5.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 382.227

Data da Relatoria: 26/06/2013

Apresentação do Projeto:

Este estudo envolve análise dos efeitos sobre o DNA de duas espécies de erva cidreira. A revisão bibliográfica embasa substancialmente o estudo apontando relevância para o mesmo.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se extratos vegetais de duas espécies de erva cidreira apresentam efeito protetor para danos no DNA. Os autores vão avaliar se os extratos produzem algum dano e se há efeito protetor em danos induzidos pelo metilmetanosulfonato. Os autores pretendem empregar no estudo a técnica de micronúcleos, análise citogenética e testes de viabilidade celular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, relacionados exclusivamente à punção venosa para obtenção de amostra sanguínea. Estes efeitos se encontram bem esclarecidos no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante e muito bem delineado e oferece riscos mínimos aos participantes, riscos muito bem esclarecidos no TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de maneira satisfatória.

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pos-Graduação

Bairro: Rua Irmã Armanda Nº 10-50 **CEP:** 17.011-160

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)2107-7260

E-mail: prppg@usc.br

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORÇÃO



Continuação do Parecer: 382.227

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa não fere nenhum dos princípios éticos básicos relacionados a experimentação com seres humanos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BAURU, 03 de Setembro de 2013

Assinador por:
Rodrigo Ricci Vivan
(Coordenador)

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pos-Graduação
Bairro: Rua Irmã Armanda Nº 10-50 CEP: 17.011-160
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)2107-7260 E-mail: prppg@usc.br

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96, versão 2012)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "ANTI-/CLASTOGENICIDADE DE DUAS ESPÉCIES DE ERVA-CIDREIRA: *LIPPIA ALBA* E *MELISSA OFFICINALIS*", por ser indivíduo saudável, sob responsabilidade da pesquisadora Marilanda Ferreira Bellini. O estudo será realizado com sangue para obtenção de células que serão mantidas em laboratório. Haverá um risco mínimo para saúde caracterizado por hematomas e dor no local da coleta de sangue. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas, sem a sua identificação. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para a correta utilização de erva-cidreira em tratamentos de ansiedade. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005. (caso envolva armazenamento de material biológico). Diante das explicações, se você concordar em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____ de _____ de 20 _____

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário, ou seu representante, e a outra ao pesquisador responsável.

Nome Pesquisador (a): Marilanda Ferreira Bellini	Cargo/Função: Docente
Instituição: Universidade Sagrado Coração (USC)	
Endereço: Rua Irmã Arminda, 10-50, Bloco L, Bauru, SP, CEP: 17011-160	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração - USC	
fone 14 21077260 Fax: 14 21077254	e-mail:marilanda.bellini@usc.br