

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

PAULA DANIELLE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE
MELISSA OFFICINALIS: PELO TESTE DE
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS, EM
LINFÓCITOS HUMANOS**

BAURU

2015

PAULA DANIELLE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE
MELISSA OFFICINALIS: PELO TESTE DE
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS, 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

R6962a

Rodrigues,Paula Danielle

Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica de extratos alcóolicos de *Melissa officinalis*: pelo teste de micronúcleo em células binucleadas, em linfócitos humanos/ Paula Danielle Rodrigues. -- 2015.

27f. : il.

Orientadora: Profa.Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

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

1.Erva-cidreira. 2. *Melissa officinalis*. 3. Teste de micronúcleo em células binucleadas. 4. Mutagenicidade. 5. Antimutagenicidade. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.

PAULA DANIELLE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA
DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *MELISSA OFFICINALIS*: PELO
TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS, EM
LINFÓCITOS HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Saúde, da Universidade Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini
Universidade do Sagrado Coração

Bacharel Jéssica Cristina Dos Santos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Bauru, 02 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de atingir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Albertino e Joaquina (*in memorian*), por todo o esforço, e por terem acreditado na minha capacidade. A minha mãe que me deu conselhos sábios e sempre sonhou com este dia, e onde quer que ela esteja está muito feliz. Ao meu pai que sempre foi meu exemplo de ser perseverante e ir atrás dos meus sonhos.

Aos meus avôs João e Paula (*in memorian*), pelo carinho e conselhos, que me capacitaram atingir meus objetivos.

Aos amigos que fiz durante a graduação que me apoiaram nos momentos difíceis.

A minha orientadora Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, que sempre foi muito prestativa e me ajudou dando conselhos e estimulando meu desempenho. Muito obrigada pela paciência e confiança.

Sou grata a Universidade do Sagrado Coração pelo acolhimento, ensinamento, e por ter me proporcionado realizar esse sonho.

RESUMO

Melissa officinalis é conhecida popularmente como erva cidreira e vem sendo muito utilizada pelos seus efeitos terapêuticos no tratamento de moléstias. Entretanto, o seu efeito tóxico é pouco abordado em estudos científicos. Assim o presente estudo teve como objetivo investigar as atividades mutagênicas e antimutagênicas de extratos alcóolicos de *Melissa officinalis*, em linfócitos humanos, através do teste de micronúcleo em células binucleadas. Para realizar o teste, foi coletado sangue periférico de 4 voluntários, e colocados em meio RPMI, com soro fetal bovino, fitohemaglutinina A, penicilina-estreptomicina, e depois incubado a 37°C por 6 horas. Após esse período, os tratamentos de mutagenicidade e antimutagenicidade foram realizados. Tendo como Controle Negativo (30 µL de dimetilsulfóxido - DMSO), Controle Positivo (1 µg/mL de metilmetanosulfonato - MMS), Extrato Etanólico de *M. officinalis* (EE - 100µg/mL), Extrato Metanólico de *M. officinalis* (EM - 100µg/mL), Extrato etanólico de *M. officinalis* + MMS (EE -100µg/mL + 1 µg/mL de MMS), Extrato metanólico de *M. officinalis* + MMS (EM - 100µg/mL + 1 µg/mL de MMS) por 72 horas. Para o teste de viabilidade celular foram utilizados 10 uL da suspensão celular. As lâminas para análise de micronúcleo em células binucleadas foram preparadas por gotejamento, coradas com Giemsa a 8% e a análise foi realizada em microscópio de luz, com aumento final de 400x, contando em média 400 células binucleadas. A viabilidade celular foi superior a 99% em todos os tratamentos, indicando inexistência de citotoxicidade dos extratos de *Melissa officinalis* testados em linfócitos humanos. No teste de micronúcleo EM e EE não apresentaram efeito genotóxico. Na antigenotoxicidade o EM e EE não protegeram o DNA da ação do MMS.

Palavras-chave: Erva-cidreira. *Melissa officinalis*. Teste de micronúcleo em células binucleadas. Mutagenicidade. Antimutagenicidade.

ABSTRACT

Melissa officinalis popularly known as lemon balm, it is used for their therapeutic effects in the treatment of diseases. However, your toxic effect is not much discussed in scientific studies. Therefore, this study aimed to investigate the mutagenic and antimutagenic activities of alcoholics extracts of *Melissa officinalis* in human lymphocytes, by micronucleus test in binucleated cells . To perform the test, peripheral blood was collected from four volunteers and was added a culture medium containing RPMI, fetal bovine serum, phytohemmagutinin A and antibiotics and incubated at 37° C, by 6 hours. After this period, the treatments of mutagenic and antimutagenic were performed. As Positive control (1 µg/mL MMS), negative control (30 µL DMSO), Ethanol extract of *M. officinalis* (100µg/mL), Methanol extract of *M. officinalis* (100µg/mL), Ethanol extract of *M. officinalis*+ + MMS (100µg/mL + 1 µg/mL de MMS) and Methanol extractof *M. officinalis* + MMS (100µg/mL + 1 µg/mL de MMS, by 72 hours. For cell viability assay was used 10 uL of cell suspension. The blades to micronucleus binucleated cells analysis were prepared by drip, stained with Giemsa to 8% and the analysis was performed under light microscope, with magnification of 400x, relying on average 400 binucleated cells. Cell viability was higher than 99% in all treatments, indicating lack of citotoxicity of *Melissa officinalis* extracts tested on human lymphocytes. Micronucleus test the methanol and ethanol extracts no showed genotoxic effects. In antigenotoxicity EE and EM extracts did not protect the DNA of the MMS action.

Keywords: Lemon balm. *Melissa officinalis*. Micronucleus test in binucleated cells. Mutagenicity. Antimutagenicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca – cálcio

CtB – citocalasina-B

DM – desvio médio

DMSO – Dimetilsulfóxido

g – grama

IM – índice mitótico

Mg – magnésio

mg – miligrama

µg - micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetro

mL – mililitro

MMS – Metilmetanosulfonato

PBS – tampão fosfato

pH - potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	MEDICINA POPULAR.....	9
1.2	ERVA CIDREIRA	9
1.2.1	Melissa officinalis	10
1.3	MUTAÇÕES E MICRONÚCLEO.....	11
1.4	<i>Melissa officinalis</i> E ATIVIDADE GENOTÓXICA	12
1.5	JUSTIFICATIVA	13
2	OBJETIVOS.....	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 DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS	17
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEDICINA POPULAR

O Brasil por dispor de uma grande variedade de espécies vegetais, se tornou um dos países que mais faz uso de fitoterapia, atrelado ao baixo custo se comparado com o medicamento sintético (SANTOS et al.; 2011). Em decorrência disso, nos últimos anos cresceu o interesse científico nesta área, logo que muitas pessoas julgam erroneamente a terapia vegetal como sendo mais saudável por terem menos efeitos adversos. A população acredita que tudo que é natural não causa dano, quando na verdade existem poucas comprovações científicas e garantia da qualidade da maioria delas (MENGUE; MENTZ; SCHENKEL; 2011).

A grande parte das plantas ainda é desconhecida na visão científica principalmente no estudo químico e farmacológico. (CECHINEL FILHO; YUNES; 1998). Pesquisas realizadas mostram que existem plantas que possuem componentes tóxicos, e devem ser utilizadas com cuidado e na quantidade certa, pois seu uso abusivo pode causar efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo (RODRIGUES et al., 2011).

Estudos envolvendo plantas medicinais devem ser mais aprofundados, pois além de averiguar seus efeitos toxicológicos, é de extrema importância que seja mais explorado os efeitos benéficos que essas plantas podem trazer ao organismo. Existem estudos que apontam que algumas plantas medicinais possuem uma ação protetora e reparadora conservando a integridade do material genético, podendo futuramente ser usada no tratamento do câncer (BERHOW et al., 2000).

1.2 ERVA CIDREIRA

A Erva Cidreira, popularmente chamada como melissa ou cidreira, é utilizada para tratar enfermidades por possuir propriedade analgésica, antiespasmódica, calmante, sedativa e citostática (MING, 1992). Porém os efeitos na saúde humana e no material genético são pouco abordados cientificamente (CARVALHO et al. , 2011).

1.2.1 *Melissa officinalis*

Melissa officinalis ou erva-cidreira verdadeira, pertence à família Lamiaceae, sua origem é asiática e européia (MEIRA; MARTINS; MANGANOTTI, 2012). É uma espécie abundante, herbácea, tendo um tamanho variado de 20 a 80 cm. Seu caule é em formato quadrangular com tufos, se ramifica formando touceiras com raízes fibrosas (MEIRA; SOUZA; MARTINS, 2010). As folhas são membranáceas com coloração verde-escura na parte superior e verde-clara na base, possuem nervuras bem nítidas, são lanceoladas, pecioladas, de formato oval e seu comprimento é em torno de seis centímetros (Figura 1) (COUTO, 2006; CORREA JÚNIOR et al., 1991; citados por MEIRA; SOUZA; MARTINS, 2010).

Figura 1- *Melissa officinalis*



Fonte: Lorenzi e Matos (2002, p. 245).

Como fitoterápico é utilizada a parte aérea da *Melissa officinalis* no tratamento de febres, indigestão, hipertireoidismo, depressão, insônia e epilepsia (CARNAT et al., 1998; HERODEZ et al., 2003; SALAH AND JÄGER, 2005; DASTMALCHI et al. ; 2008 citados por CARVALHO, 2011). Além de serem usadas no tratamento de moléstias, suas folhas são utilizadas na culinária (CARVALHO et al., 2005; COUTO,2006; BERTOLUCCI et al., 2008). Por isso se torna essencial entender como as substâncias químicas da planta reagem no organismo.

M. officinalis produz óleos essenciais como o citronelal, taninos, flavonóides, alcalóides e resinas, presentes nos tricomas das flores e folhas (LORENZI; MATOS, 2002; MAY et al., 2008 citados por MEIRA; SOUZA; MARTINS, 2011). O óleo essencial é destaque na indústria farmacêutica pela atividade antioxidativa, antibiótica, antifúngica, antibacteriana e sedativa (HABER et al., 2005; BLANK et al., 2006). Segundo estudos realizados por Blank et al. (2005) a composição química do óleo essencial é influenciada pelo tempo de colheita, sendo em torno das 17 horas o período mais apropriado quando se pretende obter maior teor dele.

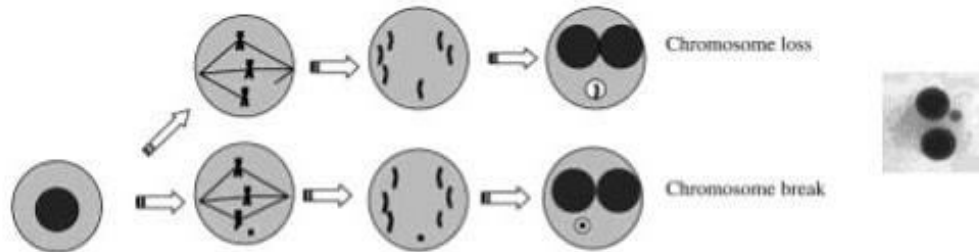
1.3 MUTAÇÕES E MICRONÚCLEO

Mutação é qualquer alteração do genótipo, que surge de forma aleatória, podendo ser alterações submicroscópicas, ou seja, alterações nas sequências de bases do DNA (mutações gênicas), que ocorrem durante a replicação do DNA, ou alterações visíveis ao microscópio (aberrações cromossômicas) (BEIGUELMAN, 2008).

Micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo na divisão celular, e estão ligados a atuação de agentes genotóxicos, mutagênicos ou clastogênicos (SCHMID, 1975; DIETZ ET AL., 2000). Em vista disso, os micronúcleos auxiliam no reconhecimento de danos genéticos, pois atuam como marcadores biológicos, reduzindo em número quando o organismo cessa o contato com o agente indutor (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Por tanto o teste de micronúcleo é indicado para detectar alterações cromossômicas, além da vantagem de ser um teste rápido e simples.

Existem duas substâncias genotóxicas responsáveis pela formação de micronúcleo: substância clastogênica, o micronúcleo é formado quando ocorre a quebra dos cromossomos; substância aneugênica, atua interferindo na formação do fuso mitótico durante a divisão celular, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003, citados por ALBAS et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Teste de micronúcleo exemplificando os tipos de formação de micronúcleo a partir de substâncias clastogênicas e aneugênicas.



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

1.4 *Melissa officinalis* E ATIVIDADE GENOTÓXICA

M. officinalis possui vários compostos que são utilizados com o intuito medicinal. Em geral, plantas medicinais quando ingeridas de forma exagerada podem ser mutagênicas ou carcinogênicas (PERON et al., 2008). No entanto, existem estudos científicos que relatam o efeito antimutagênico de carotenóides como α -caroteno e β -caroteno encontrados em frutas que ajudam na prevenção de doenças como o câncer (NISHINO, 1998). Estudos sobre a toxicidade de plantas medicinais são escassos e visto que a população faz uso indiscriminado dessas plantas sem ter um conhecimento aprofundado de suas propriedades químicas (ALVES et al., 2009; PERON et al., 2008), é necessário que sejam realizados mais estudos sobre a toxicidade da erva cidreira, também testando a quantidade ideal que deve ser ingerida sem prejudicar o organismo.

Um estudo realizado por Carvalho et al. (2011) em células sanguíneas de ratos, mostrou que o extrato de *M. officinalis* possui propriedades antígeno-tóxicas e antimutagênicas, supõe-se que devido à presença de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos que são produzidos pela *M. officinalis* funcionam como uma barreira protetora contra danos causados ao DNA por radicais livres (FRANKE et al., 2005; CANADANOVIC-BRUNET et al., 2008, PEREIRA et al., 2009 citados por CARVALHO et al., 2011).

Neste trabalho foi analisado o potencial genotóxico da espécie *Melissa officinalis*, a qual tem recebido destaque no mercado fitoterápico.

1.5 JUSTIFICATIVA

As plantas secretam componentes químicos tóxicos como forma de proteção contra predadores, vírus, fungos e bactérias. Devido a isto se torna de grande interesse científico, explorar os estudos toxicológicos e genotóxicos, logo que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 80% da população fazem uso de fitoterápicos. É preciso conhecer a ação de determinados componentes químicos, principalmente genotoxinas, que agem nos ácidos nucléicos, comprometendo a integridade do DNA.

Por tanto é necessário conhecer o potencial genotóxico da *Melissa officinalis*, visto que é de uso diário muitas vezes indiscriminado da população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades mutagênica e antimutagênica de extratos alcóolicos de *Melissa officinalis*, *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a indução de micronúcleos em células binucleadas, pelo tratamento com extratos etanólico e metanólico de *Melissa officinalis*, em cultura de linfócitos humanos;

b) Observar o efeito antimutagênico em células binucleadas, dos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Melissa officinalis*, 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 *Melissa officinalis* foi obtido, já seco, 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.

3.2 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 7mL de sangue periférico em seringa descartável heparinizada, no período de 2013 a 2014. Após a coleta, a seringa foi deixada em posição vertical, evitando o calor e agitação, a fim de prevenir hemólise.

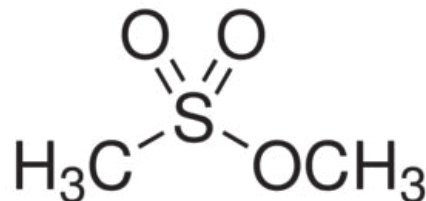
Em um frasco de cultura contendo 5mL de meio RPMI 1640 com Hapes (Cultilab, Brasil), 20% de soro fetal bovino (Inativado, estéril, isento de mycoplasma – Cultilab, Brasil), 2% de fitohemaglutinina A (Gibco, USA, Cat.# 10576-015), e 1%

de penicilina-estreptomicina (Gibco, USA, Cat.# 15140-148), adicionou-se aproximadamente 0,5 mL de sangue periférico, o qual foi incubado a 37°C em estufa (502 FANEM – São Paulo – Brasil), por 6 horas. Após esse período, os tratamentos de mutagenicidade e antimutagenicidade foram realizados.

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), 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 3 –Estrutura Molecular de Metilmetanosulfonato.



Fórmula Linear CH₃SO₃CH₃.
Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

3.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram realizados simultaneamente por 72h.

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

3.7 TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS

Após 44 horas de incubação adicionou-se 100 μ L de Citocalasina-B (6 μ g de CtB/mL da cultura – REF. C6762, SIGMA-ALDRICH, BRASIL) em cada frasco de cultura, e foi conservado em estufa por mais 28 horas. Os procedimentos para a colheita e a fixação foram baseados em Salvadori, Ribeiro e Natarajan (1993) e o material foi armazenado a 2°C até o momento da análise. As lâminas foram montadas por gotejamento e os linfócitos foram corados com Giemsa diluído em tampão fosfato (0,06M), pH 8,0, 8% por 4 minutos. A análise foi realizada em microscópio de luz, contando em média 400 células binucleadas por tratamento/voluntário, analisando a presença ou ausência de micronúcleo. Os critérios utilizados para a análise dos micronúcleos em células binucleadas foram baseados em Fenech (2000) e Bückner; Carvalho; Alves-Gomes (2006), com modificações.

3.8 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 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise de viabilidade celular pelo método Azul de Trypan mostraram uma viabilidade superior a 99% nos tratamentos com extratos metanólico e etanólico de *Melissa officinalis*, indicando inexistência de citotoxicidade de ambos, em linfócitos humanos (Tabela 1).

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

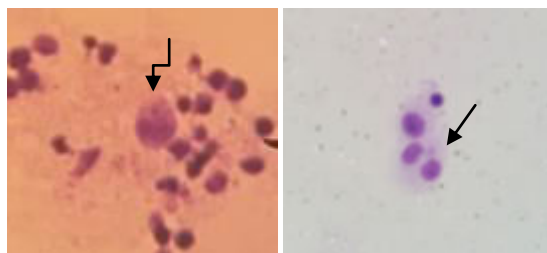
Tratamentos	Viabilidade Celular
	Média ±DP
Controle Negativo (DMSO)	100,00 ± 0,004 ^{ns}
Controle Positivo (MMS)	99,99 ± 0,010 ^{ns}
Genotoxicidade	
EM <i>M. officinalis</i>	99,99 ± 0,011 ^{ns}
EE <i>M. officinalis</i>	99,99 ± 0,033 ^{ns}
Antigenotoxicidade	
EMM. <i>officinalis</i>	100,00 ± 0,000 ^{ns}
EEM. <i>officinalis</i>	99,99 ± 0,084 ^{ns}

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

Fonte: elaborado pela autora.

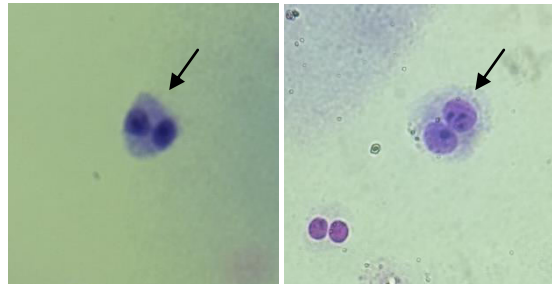
Na figura 4, é possível visualizar os linfócitos binucleados que apresentam micronúcleos, e na figura 5, as células sem micronúcleo.

Figura 4- Linfócitos binucleados com presença de micronúcleo corados com Giemsa, no aumento de 400x.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5- Linfócitos binucleados com ausência de micronúcleo corados com Giemsa, no aumento de 400x.



Fonte: Elaborado pela autora.

Podem ser observados na tabela 2 os resultados da análise de micronúcleo em células binucleadas. O controle positivo apresentou $13,75 \pm 3,50$ (média \pm desvio padrão) células binucleadas com micronúcleo, e o controle negativo apresentou $6,00 \pm 3,50$, sendo $p=0,0092$, por tanto houve diferença significativa entre eles, ou seja, a ação do metilmetanosulfonato teve efeito sobre o material genético. A análise de genotoxicidade não apresentou diferença significativa, sugerindo que os extratos de *M.officinalis*, não têm efeito genotóxico em linfócitos humanos. Na análise de antigenotoxicidade o EM + MMS ($9,00 \pm 8,5$) e EE + MMS ($14,5 \pm 7,25$) não apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em relação ao MMS ($13,75 \pm 3,50$), portanto os extratos alcóolicos não protegem o DNA dos danos causados pelo MMS. Desta forma, os extratos metanólico e etanólico não induzem danos ao DNA, e quando associados ao MMS não protegem o DNA.

No presente estudo verificou-se que os extratos etanólicos e metanólicos de *M. officinalis* não causam danos ao DNA dos linfócitos humanos, entretanto, no trabalho de conclusão de curso de Carvalho et al. (2009) foi realizado um estudo, *in vivo*, para avaliar a ação genotóxica e antigenotóxica dos extratos de *Melissa officinalis* com a indução do metilmetanosulfonato (MMS) utilizando o teste cometa. Nos resultados observou-se baixos níveis de genotoxicidade, e com relação à antigenotoxicidade notou-se que os tratamentos com extrato hidroalcoólico de *Melissa officinalis* ocorreu uma redução de indução de danos pelo MMS, indicando que do extrato teve proteção parcial.

Tabela 2 - Avaliação de genotoxicidade e antigenotoxicidade de extratos metanólicos e etanólicos de *Melissa officinalis* pelo teste de micronúcleo em células binucleadas em linfócitos humanos.

Tratamentos		Células Binucleadas	Células Binucleadas com Micronúcleo	
		Total	Total	Média ± DP
Controle (DMSO)	Negativo	4980	24	6,00±3,50 ^a
Controle (MMS)	Positivo	4307	55	13,75±3,50 ^b
Genotoxicidade				
		EMM. <i>officinalis</i>	73	18,25±11,37 ^a
		EE M. <i>officinalis</i>	46	11,5±7,25 ^a
Antigenotoxicidade				
		EM <i>M. officinalis</i> + MMS	36	9,00±8,5 ^b
		EE <i>M. officinalis</i> + MMS	58	14,5±7,25 ^b

DMSO= dimetilsulfóxido (30 µL); MMS= metilmetanosulfonato (1 µg/mL); EE= extrato etanólico (100µg/mL); EM= extrato metanólico (100µg/mL); DP= desvio-padrão; ^{a, b} Teste t-*Student* pareado, bicaudal, 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).

Fonte: elabora pela autora

Em outro estudo, Carvalho e colaboradores (2011), realizaram em ratos os tratamentos com extrato etanólico e extrato aquoso de *M. officinalis* por duas semanas, previamente tratados com doses de MMS, por injeção intraperitoneal. Os resultados obtidos foram dão embasamento ao presente estudo, pois constatou-se que o extrato etanólico não exerceu efeito genotóxico ou mutagênico em amostras de sangue e medula óssea. No entanto, o extrato etanólico exerceu um efeito antigenotóxico nas células sanguíneas. O teste de micronúcleo evidenciou o efeito protetor, porém só quando o extrato etanólico foi administrado em altas doses. Portanto, as diferentes concentrações de extratos utilizadas nos dois estudos, sendo mais alta que a quantidade deste, e por se tratar de um ensaio *in vivo*, podem explicar os diferentes resultados com relação à antigenotoxicidade, devido a atividade de metabolização, em comparação com o presente estudo. Porém o efeito genotóxico desempenhado pelos extratos etanólico e metanólico foi compatível com os resultados obtidos nos outros estudos.

Assim como o presente estudo Marongiu et al. (2004) realizou testes *in vitro*, no entanto, analisou a atividade antioxidativa de extrato de *M. officinalis* das subespécies *officinalis* e *inodora*. As amostras foram testadas por autooxidação e o ferro ou oxidação mediada de ácido linoléico (EDTA) sem a presença de um solvente. Ambos os extratos apresentaram ação antioxidativa. A metodologia aplicada neste estudo pode explicar o efeito antioxidativo do extrato já que não foi utilizado solvente.

Sendo assim, não apenas estudos que abordam a ação antígenotóxica dos extratos de *M. officinalis*, são de grande relevância científica, mas também estudos sobre sua ação antioxidativa, logo que, alguns estudos têm mostrado a ação dos extratos de *M. officinalis*, no tratamento de câncer (SOUSA et al., 2004) e na prevenção de doenças neurológicas como Alzheimer, quando associados ao estresse oxidativo (AKHONDZADEH et al., 2003; PEREIRA et al., 2009).

Por tanto, apesar de se supor que os extratos de *M. officinalis* podem trazer benefícios como a ação protetora para o organismo, é necessário investigar a concentração ideal desses extratos, para que tenham uma ação benéfica para o organismo, e pelo fato de ter um conjunto de fatores que influenciam quando tratados *in vivo* os resultados podem ser diferentes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados sugere que os extratos etanólico e metanólico de *Melissa officinalis* não são genotóxicos, pois não induzem a formação de micronúcleos em linfócitos humanos. Quando associado ao metilmetanosulfonato ambos extratos não protegem o material genético.

Alguns estudos sobre os extratos de *Melissa officinalis* mostraram que quando associados ao MMS em maior quantidade pode-se ter um efeito de redução na genotoxicidade.

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**, Iran, v.74, n. 7, p.863-866, jul. 2003
- ALBAS, C. S. et al. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.16, n.2, p.345-349, 14 jan. 2014. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n2s1/06.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2015.
- ALVES A. M. et al. Genotoxic and Mutagenic Effects of *Melissa officinalis*(Erva Cidreira) Extracts. **The Open Toxicol J.**, São Paulo, n.3, p. 58-69, 2009. Disponível em : < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572011000200021&lng=en&nrm=iso> . Acesso em : 30 may. 2015.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de Populações Humanas**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto (SBG), cap. 6, p. 149, 2008.: Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto (SBG), cap. 6, p. 149, 2008.
- BERHOW, M. et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research**, v.448, p.11-22, [S.I.]:Elsevier Science, 14 Mar. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751618>>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, A. O.; PINTO, J. E. B. P. **Guia das plantas medicinais**. In: LAMEIRA, A. O.; PINTO, J. E. B. P. (ed.). Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 199-201, 2008.
- BLANK, A.F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.1, p.73-78, 2005. Disponível em : < http://www.sbpmed.org.br/download/issn_05_4/artigo14_v8_n1.pdf>. Acesso em 22 mar. 2015.
- BLANK, A.F. et al. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, p.195-198, apr./jun. 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362006000200014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23 mar. 2015.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aa/v36n3/v36n3a11.pdf>> . Acesso em: 25 mar. 2015
- CANADANOVIC-BRUNET, J. et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. **J. Med. Food**, p.133-143, 24 mar. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361749> >. Acesso: 23 mar. 2015.

CARNAT A. P. et al. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. **Pharm Acta Helv**, v.72, p.301-305, France: Elsevier Science, 30 apr.1998.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005. Disponível em: < http://www.sbpmmed.org.br/download/issn_05_3/artigo4_v7_n3.pdf>. Acesso em 20 mai. 2015

CARVALHO, N. C. et al. **Avaliação do potencial Genotóxico e Antigenotóxico de *Melissa officinalis***. 2009. 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

CARVALHO, N. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 34, n. 2, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v34n2/21.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, fev. 1998. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n1/3475.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 91p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 157).

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.

DASTMALCHI K. et al. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **LWT-Food Sci Technol**, Finland: Elsevier Science, v.41, p.391-400, 2008.

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 46, n. 3, sept. 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v46n3/3078.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U.M. Teste de Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 1, n. 3, p. 337-40, 2008.

FRANKE, S.I.R. et al. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. **Mutagenesis**, 2005, 20, 279-283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956044>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

HABER, L. L. et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha piperita* e *Melissa officinalis*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1006-1009, 2005.

HERODEZ S.S et al. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chem**, v. 80, p. 275-282, 2003.

KIRSCHVOLDERS M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, Amsterdam, v.540, n.2, p.153-63, 2003.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**. p.512, 2002.

MARONGIU, B. et al. Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. **Phytother. Res.**, v.18, n. 10, p.789–792, oct. 2004.

MASCOTTI, K; MCCULLOUGH, J; BURGER, SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Rev. Transfusion*, **Blackwell Science Inc**, V. 40, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864990> >. Acesso em: 18 May 2015.

MAY, A. et al. Produtividade da biomassa de melissa em função de intervalo de cortes e doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.312-315, 2008.

MEIRA M. R., SOUZA S. A. M. , MARTINS E. R. Plantas medicinais, produção e cultivo da *Melissa officinalis* L. no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.10, p.1-11, 2011.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 352-357, 2012. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14n2/15.pdf>>. Acesso em 19 may. 2015.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 11, n. 1, 2001 . Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v11n1/a04v11n1.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br. - Verbenaceae**. Curitiba: UFPr, 1992, 206 p. (Tese mestrado).

NISHINO, H. Cancer prevention by carotenoids. **Mutat Res.**, v. 402, n.1-2, p. 159-163, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675267>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

PEREIRA, R.P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochem. Res.**, v. 34, p. 973-983. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853256>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

PERON, A.P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Rev. Bras. Biocien.** v.6, p.127-130, 2008.

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. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2013.

RODRIGUES, H.G. et al . Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 13, n. 3, 2011 . Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n3/a16v13n3.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

SALAH S. M.; JÄGER A. K . Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. **J. Ethnopharmacol**, v.97, p.145-149, 2005.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO L. R.; NATARAJAN, A.T. The anticlastogenicity of b carotene evaluated on human hepatoma cells. **Mutation Reserach**, v. 303, p. 151-156, [S.I.]:Elsevier Science. dec. 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694132>> Acesso em: 24 mai 2015

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, vol.13, n.4, p. 486-49, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n4/a14v13n4.pdf>>. Acesso em: 13 mai 2015.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat Res.**, Vol. 3, n.1, p. 9-15, feb. 1975. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/48190> >. Acesso em: 25 mai 2015.

SIGMA-ALDRICH. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. **Sigma-Aldrich**, 2013. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=129925&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F129925%3F1ang%3Dpt>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

SOUSA et al. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 56. n. 5, p. 677-681, may. 2004.