

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**MAYUME DE MATOS YONASHIRO**

**ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE  
*LIPPIA ALBA* EM DIFERENTES FASES DO DIA  
ALTERAM AS ATIVIDADES CITOTÓXICAS,  
GENOTÓXICAS E MUTAGÊNICAS, EM CÉLULAS DE  
TUMOR DE EHRLICH E CÉLULAS NÃO TUMORAIS**

BAURU  
2016

**MAYUME DE MATOS YONASHIRO**

**ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE  
*LIPPIA ALBA* EM DIFERENTES FASES DO DIA  
ALTERAM AS ATIVIDADES CITOTÓXICAS,  
GENOTÓXICAS E MUTAGÊNICAS, EM CÉLULAS DE  
TUMOR DE EHRLICH E CÉLULAS NÃO TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, da Universidade do Sagrado Coração como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

BAURU  
2016

Yonashiro, Mayume de Matos

Y55a

Administração de extratos alcóolicos de *Lippia alba* em diferentes fases do dia alteram as atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, em células de tumor de Ehrlich e células não tumorais / Mayume de Matos Yonashiro. -- 2016.

39f. :il.

Orientadora: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

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

1. Citotoxicidade. 2. Erva-cidreira. 3. Genotoxicidade. 4. Tumor de Ehrlich. 5. Mutagenicidade. I. Bellini, Marilanda Ferreira.  
II. Título

**MAYUME DE MATOS YONASHIRO**  
**ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATOS ALCÓOLICOS DE *LIPPIA ALBA* EM**  
**DIFERENTES FASES DO DIA ALTERAM AS ATIVIDADES CITOTÓXICAS,**  
**GENOTÓXICAS E MUTAGÊNICAS, EM CÉLULAS DE TUMOR DE EHRLICH E**  
**CÉLULAS NÃO TUMORAIS.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, da Universidade do Sagrado Coração como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Cleide Aparecida Bomfeti  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

---

Mestranda Thaís Bernardes de Queiroz  
Programa de Biologia Aplicada - Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu/SP

---

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 25 de Novembro de 2016

Dedico este trabalho a turma de Ciências  
Biológicas/Bacharelado, 2016; à Profa.  
Dra. Marilanda Bellini e à Profa. Dra.  
Maricê Heubel.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Silvana e Shigueo, que lutaram por mim e me proporcionaram a graduação.

Ao meu irmão, que é meu grande companheiro na vida.

A minha orientadora, Prof. Dra. Marilanda Bellini, não somente pela orientação, mas pela paciência e amizade, por ter me apresentado à ciência.

A Profa. Dra. Dulce Helena Constantino pelo manuseio e inóculo de tumor de Ehrlich nos animais.

A Profa. Dra Rita Luiza Peruquetti pelo auxílio na divisão dos grupos em fase clara e fase escura.

A veterinária Daniela Farias da Nóbrega pelo auxílio com as análises de coloração diferencial de leucócitos.

A Profa. Dra. Sandra Simeão pelo auxílio com a análise estatística.

Ao Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves pela supervisão no preparo dos extratos e pelas caracterizações dos mesmos, em andamento.

As Profas Dra. Angela Kinoshita e Ma. Márcia Marcelino pelo empréstimo das cânulas de gavagem.

Aos amigos Francisco, Gustavo e Júlio César que nunca me deixaram desistir.

Às amigas Patrícia e Maria Carolina, pelas férias que passamos dentro da universidade.

À Mariana, Olivia, Murilo, Felipe e Walter, meus companheiros de classe que caminharam comigo nos últimos anos.

Ao Guilherme Falcão que me entendeu e estendeu as mãos de forma única.

A Universidade do Sagrado Coração e ao Centro de Ciências da Saúde pela oportunidade concedida para realização de meus estudos.

Ao CNPq pelo fomento ao projeto.

A todos que me auxiliariam direta ou indiretamente.

Meus sinceros agradecimentos!

*“And I wonder if everything could ever feel  
this real forever, if anything could ever be  
this good again.”*

*Everlong – Foo Fighters*

## RESUMO

O uso de plantas medicinais cresce diariamente, à medida que a população busca alternativas naturais para o tratamento de doenças e melhoria na qualidade de vida. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma das espécies de erva-cidreira mais comumente empregadas na medicina popular brasileira. Para investigar citotoxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos (EE) e metanólico (EM) de *Lippia alba* (LA), camundongos swiss foram divididos em 4 grupos de tratamentos (CEUA/USC N° 8706290315), recebendo-os em fase clara ou em fase escura: (C) saudáveis; (CT) inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (TE); (EELA) com administração de EELA e inoculados com TE e (EMLA) com administração de EMLA e inoculados com TE. 100 mg dos extratos/kg de peso foram administrados, diariamente, 14 dias, via gavagem. No 7º dia, inóculou-se TE ( $10^3$  células). Os animais foram pesados nos dias 0, 7 e 15. Após a eutanásia coletou-se o lavado peritoneal para realização de contagem de células tumorais, viabilidade celular, cometa e contagem diferencial de leucócitos; sangue periférico para micronúcleo, cometa e viabilidade celular e medula óssea para teste de micronúcleo. Os extratos alcoólicos de *Lippia alba* não interferiram no ganho de massa dos animais, independente da fase de administração dos mesmos. A viabilidade de eritrócitos apresentou-se maior do que a de células tumorais, entretanto, os extratos aumentaram a viabilidade de células tumorais. Sugere-se que os extratos alcoólicos de *Lippia alba* possam apresentar atividade imunomodulatória, devido ao aumento significativo na população de linfócitos. De acordo com as comparações dos resultados entre as salas de fase clara e fase escura, é recomendado que os extratos sejam administrados em fase escura, onde observou-se inibição da progressão tumoral e encaminhamento de células tumorais a apoptose. Entretanto, sugere-se cautela, visto que estes extratos também causaram danos em células não tumorais, em ambas fases de administração.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Erva-cidreira. Genotoxicidade. Infiltrado inflamatório. Mutagenicidade. Tumor de Ehrlich.



## SUMÁRIO

<b>1 Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 <i>Lippia alba</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Tumor de Ehrlich .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Ritmos Biológicos .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Justificativa .....</b>	<b>13</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Material Botânico .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Testes <i>in vivo</i>.....</b>	<b>15</b>
4.2.1. Grupos experimentais .....	15
4.2.2 Obtenção, contagem, viabilidade e inóculo das células tumorais .....	17
4.2.3 Obtenção do lavado peritoneal .....	18
4.2.4 Avaliação do crescimento do tumor .....	18
4.2.5 Contagem de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal .....	18
4.2.6 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue Periférico de Roedores.....	19
4.2.7 Teste do Cometa.....	19
<b>4.3 Análise Estatística .....</b>	<b>21</b>
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>22</b>
<b>6 Considerações Finais.....</b>	<b>34</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO A – PARECER CEUA.....</b>	<b>42</b>

## 1 Introdução

A ansiedade é um mal comum do homem contemporâneo devido à rotina atribulada e repleta de agentes estressores, levando a população a buscar ajuda de profissionais e intervenções fármaco-terapêuticas (ESTEVES, 2009), tendo em vista que a população têm utilizado plantas medicinais como calmante, contra gripe, contra infecções, sendo administradas na forma de chá na maioria das vezes. Essas plantas muitas vezes são obtidas em cultivo próprio. Destacando erva-cidreira, camomila e erva-doce como principais plantas utilizadas como ansiolíticas (BRASILEIRO et al, 2008).

### 1.1 *Lippia alba*

Dentre estas plantas muito utilizadas na medicina popular, citaremos a erva-cidreira. Nome popularmente empregado para a espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (família Verbenaceae) (Figura 1) (SIMOES et al., 2001) que é uma espécie de planta arbustiva, nativa do Brasil e América do Sul, e por ocorrer em todo o país, é uma planta muito conhecida (TAVARES et al, 2011). Variações no óleo essencial desta planta, fez com que alguns autores agrupassem-nas em quimiotipos de acordo com o componente principal de seu óleo, sendo que o primeiro (cital-limoneno) apresenta propriedades ansiolíticas. (JEZLER et al., 2012). Os quimiotipos encontrados em *Lippia alba* são citral, citral-mirceno, citral-limoneno, carvona-limoneno e linalol. Os quimiotipos que são mais consumidos nas plantas de *Lippia* são citral-mirceno e citral-limoneno, na forma de chá (SILVA et al. 2006; SIMÕES & SPITZER 2003; MATOS 2000).



Figura 1 - *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.  
Fonte: Tramil library, 2016

Extratos alcoólicos de *L. alba* e dos principais componentes de seu óleo essencial (limoneno e citral) têm demonstrado efeitos citotóxicos e antitumorais em células humanas HL-60 (leucemia promielocítica), em células humanas K562 eritroleucêmicas, em carcinoma de células humanas HepG2 (carcinoma hepatocelular) e em carcinoma de células epiteliais HeLa do colo uterino (MENEZES, 2009). Estudos mostraram a atividade citotóxica do citral, em células tumorais, inibindo o crescimento de uma cultura de células leucêmicas de ratos, não atuando em células normais do baço. Além disso, ao ativar a caspase 3, induziu a apoptose de células humanas e de ratos com leucemia. A aplicação tópica de citral a concentrações superiores a 1% tem produzido sensibilidade cutânea (MESA-ARANGO et al., 2009), alertando para possíveis efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (capacidade de causar dano irreparável ao material genético, capacidade de causar dano reparável ao material genético e nocividade sobre células comuns do organismo, respectivamente).

Citral e carvona-limoneno são dois quimiotipos dos óleos essenciais de *L. alba* que produziram uma significativa diminuição da genototoxicidade induzida pela bleomicina, sugerindo compostos quimiopreventivos. Citral, carvona e limoneno mostram propriedades protetoras *in vivo* (LÓPEZ, STASHENKO, FUENTE, 2011).

## 1.2 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é bom modelo para estudos envolvendo citologia, por crescer na forma ascítica, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas. (HOSSNE, 2002). Foi descrito por Paul Ehrlich em 1906, é uma neoplasia de camundongos, transplantável, constituída de células de origem epitelial, um adenocarcinoma de mama (EHRlich; APOLANT, 1906). Desenvolve-se em cavidades serosas, bem como em músculos; mas não se observa o crescimento em vísceras parenquimatosas.

Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal. Essa forma tem como característica grande acúmulo de fluidos no abdome (ascite) e uma baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação) (FECCHIO, 1990; HOSSNE, 2002). O tumor de Ehrlich sólido pode ser descrito morfológicamente com células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992).

## 1.3 Ritmos Biológicos

Cronobiologia é o estudo do ritmo biológico, que pode ser definido como ciclos que acontecem regularmente, que nos animais envolve ciclo de sono e vigília, atividade digestiva, produção de hormônios e diversos outros processos que ocorrem diariamente nos seres vivos, e estes são ciclos que duram 24 horas (MARQUES; MENNABARRETO 1997). Quando alterado pode provocar uma série de mudanças no organismo, desencadeando estresses, alterações de comportamento, crises de diabetes e problemas ligados à hipertensão (TOUITOU; SMOLENSKY, 2009).

Sabe-se que há uma grande variabilidade dos processos biológicos quando o ciclo circadiano é alterado e também pode aumentar o efeito de drogas e minimizar seus efeitos colaterais (SÁNCHEZ, 2005) uma vez que este ciclo é responsável pelo

controle do metabolismo geral, progressão e inibição celular, reparo do DNA, entre outros processos (LEVI, SCHIBLER, 2007; IZU, 2011).

Cronoterapia é um tipo de tratamento para determinadas doenças patológicas e somáticas que relaciona a cronobiologia com a administração de medicamentos de acordo com as variações do ciclo circadiano, que influenciam na resposta do organismo, tendo ou não maior eficácia (LIN; KAWASHIMA, 2012).

Por todas as alterações que o ritmo biológico desregulado pode causar, houve importância avaliar os diferentes momentos de administração dos extratos de *L. alba*, não só pelo consumo em larga escala da planta para fins medicinais, mas pelos estudos feitos sobre a relação do ritmo biológico com o metabolismo geral dos animais.

## 2 Justificativa

É importante investigar os efeitos de *Lippia alba*, tendo em vista que é comumente usada para o tratamento de doenças, prevenção e melhoria na qualidade de vida, já que há uma crescente busca da população por alternativas naturais, de baixo custo e fácil acesso. Nesse cenário, surgem as plantas medicinais, largamente comercializadas, empregadas na tradicional medicina popular. Por se tratarem de produtos naturais, pensa-se, erroneamente, serem completamente saudáveis, entretanto, dependendo da dosagem empregada pode ocorrer uma intoxicação, efeitos adversos ou ausência dos resultados desejados. Além disso, algumas medidas adotadas pelos usuários e comerciantes dessas plantas, alteram sua eficácia e segurança na administração. Desta forma, estudos que indiquem a atividade citotóxica e mutagênica destas plantas, em células tumorais e em células sanguíneas, é de grande relevância, na tentativa de estabelecer segurança no uso destas na medicina popular.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais tumorigênicos, citotóxicos, genotóxicos, de indução inflamatória e mutagênicos de extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba*, administrados em duas diferentes fases do dia, *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

a) Verificar a progressão tumoral em animais tratados com extratos etanólicos e metanólicos de *L. alba*, em diferentes fases do dia;

b) Investigar citotoxicidade dos extratos etanólicos e metanólicos de *L. alba* em células de tumor de Ehrlich e células sanguíneas, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan;

c) Investigar o infiltrado inflamatório do lavado peritoneal dos animais tratados com extratos etanólicos e metanólicos de *L. alba*, pela contagem diferencial de leucócitos;

d) Avaliar atividade mutagênica dos extratos etanólicos e metanólicos de *L. alba*, através do Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores e sangue periférico;

e) Avaliar atividade genotóxica dos extratos etanólicos e metanólicos de *L. alba*, através do Teste do cometa, em células tumorais e sangue periférico.

## 4. Metodologia

### 4.1 Material Botânico

O material botânico de *Lippia alba* utilizado no estudo foi obtido na Fazenda Experimental Lageado, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu/SP, da coleção de plantas medicinais existente em canteiros do Setor de Horticultura da Faculdade de Ciências Agrônomicas. Os extratos metanólico e etanólico, utilizados neste trabalho, foram previamente preparados no Laboratório de Controle Físico-químico de Medicamentos (USC), segundo Zelnick et al. (1977).

### 4.2 Testes *in vivo*

Testes *in vivo* foram realizados com 40 camundongos swiss, machos, com idade entre 70 e 85 dias, procedentes do biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dulce Helena Constantino. No decorrer dos experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, receberam água proveniente do sistema de distribuição de água da USC (*ad libitum*), ração comercial específica para camundongos, ciclos de 12h de claro/escuro, temperatura entre  $24 \pm 2$  °C e  $60 \pm 5\%$  umidade. Os animais foram observados, diariamente, para verificação de sinais clínicos de toxicidade como arrepios, relutância em se movimentar, respiração ofegante, convulsões e tremores. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional (CEUA/USC N° 8706290315 – Anexo A) e seguem as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4.2.1. Grupos experimentais

Os animais foram aclimatados por 1 semana em duas salas separadas, ambas seguindo os padrões de 12 horas com luz e 12 horas no escuro. Uma das salas se mantinha com o ciclo normal (luzes acesas as 7h e apagadas as 19h – fase clara) e a outra com o ciclo invertido (luzes acesas as 19h e apagadas as 7h – fase



escura), porém os extratos eram administrados ao mesmo tempo para ambas as salas (8h), ou seja, o grupo fase clara recebia os extratos em momento de repouso e os grupos da fase escura recebiam os extratos em momento de metabolismo ativo. Todos animais foram pesados no dia 0, antes do início dos tratamentos; no dia 07, antes do inóculo do tumor e no dia 15, antes da eutanásia.

Dentro das salas os animais foram subdivididos em grupos iguais, contendo 5 animais cada, sendo eles (Figura 2):

- 1) Controle Negativo Saudável (animais saudáveis, sem Tumor de Ehrlich, com administração de água destilada e autoclava, sem administração de extratos);
- 2) Controle Negativo Tumoral (animais inoculados Tumor de Ehrlich, com administração de água destilada e autoclava, sem administração de extratos);
- 3) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *Lippia alba* (EELA);
- 4) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *Lippia alba* (EMLA).

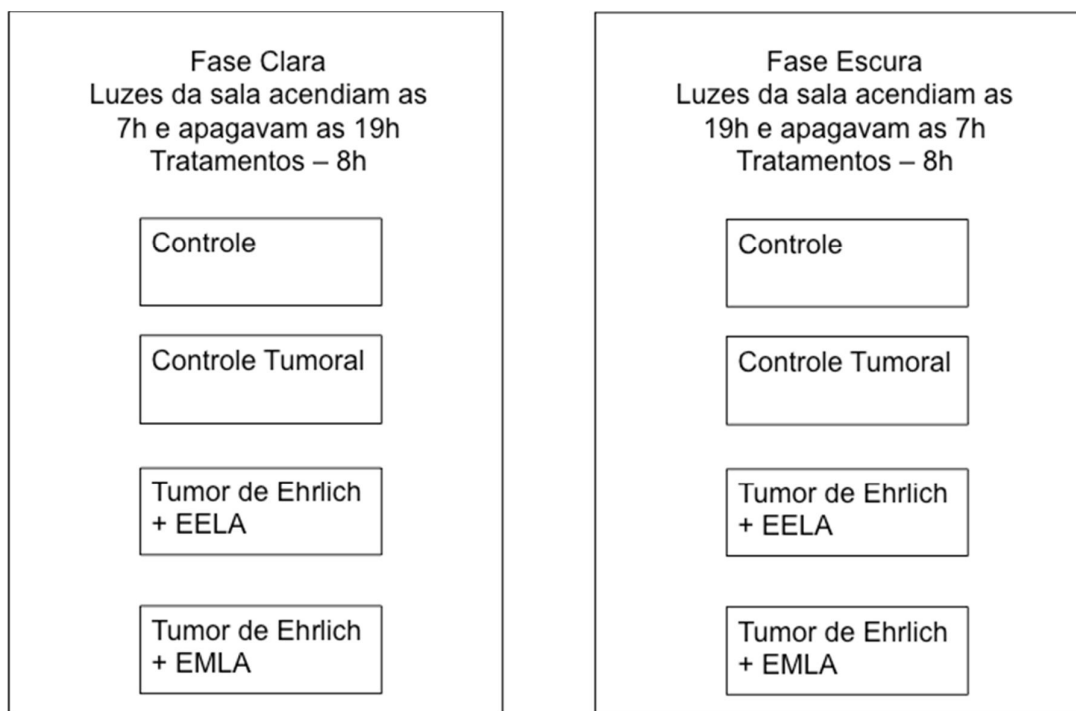


Figura 2 – Esquema representativos dos grupos nas diferentes fases de tratamentos. LA, *Lippia alba*; EE; extrato etanólico; EM, extrato metanólico.

Fonte: Elaborado pela orientadora

Foram administrados, 100 mg dos extratos/ Kg de peso corpóreo/ dia, durante 14 dias, via gavagem. No 7º dia após o início dos tratamentos, os animais foram inoculados com tumor ascítico de Ehrlich ( $10^3$  células). No 15º dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, um método aceito com restrições pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), porém necessário para que não haja interferência de drogas sobre as células neoplásicas (Figura 3).

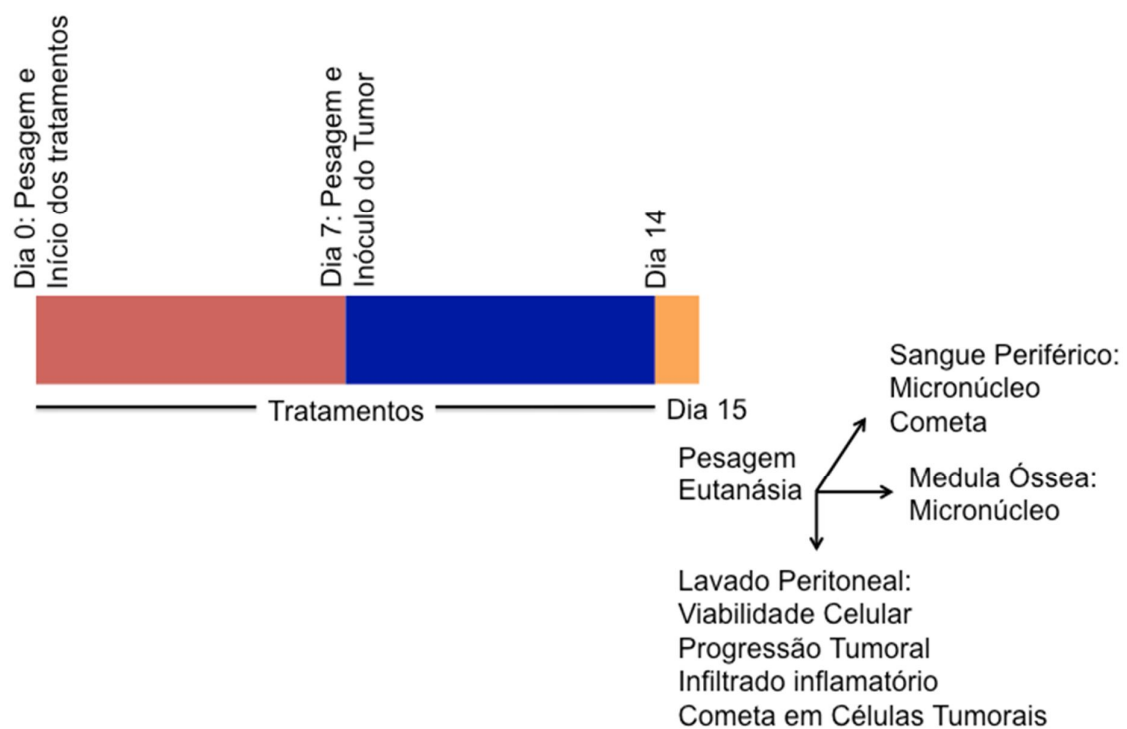


Figura 3: Linha do tempo do procedimento experimental  
Fonte: Elaborada pela orientadora

#### 4.2.2 Obtenção, contagem, viabilidade e inóculo das células tumorais

O Tumor Ascítico de Ehrlich é repicado semanalmente, por meio de transplantes intraperitoneais, em camundongos mantidos no Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração. Para a manutenção das células neoplásicas, camundongos com aproximadamente 7 dias de evolução tumoral foram eutanasiados por deslocamento cervical, para a manutenção do tumor “*in vivo*” através de repiques semanais. Aproximadamente, 3 mL do fluido ascítico foi

aspirado com seringas e agulhas descartáveis, após laparotomia. Essas células foram ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS).

A viabilidade celular/citotoxicidade foi verificada pelo método de exclusão de Azul de Trypan, onde 0,8mL da suspensão celular foram adicionados a 0,2mL de corante Azul Trypan e 10 µL desta solução foi depositado em câmara de Neubauer, encaminhadas para microscopia de luz, e procedeu-se a contagem de células viáveis (não coradas) e células não-viáveis (coradas).

Os camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com suspensão celular de Tumor Ascítico de Ehrlich ( $1,0 \times 10^3$  células), que apresentaram viabilidade celular  $\geq 95\%$ , no 7º dia experimental.

#### **4.2.3 Obtenção do lavado peritoneal**

Após a eutanásia, o animal foi posicionado em decúbito ventral e foi realizada uma antissepsia do abdome com etanol a 70%. Com auxílio de seringa descartável, foram injetados 3 mL de PBS e, com o objetivo de desprender as células tumorais das vísceras, o abdome foi massageado cuidadosamente. Posteriormente, foi realizada uma incisão na parte superior do abdome e o líquido ascítico foi recolhido, com auxílio de pipeta automática de 1000 uL, em tubos Falcon.

#### **4.2.4 Avaliação do crescimento do tumor**

Após homogeneização do lavado peritoneal, uma alíquota de 80uL foi incubada com 120uL de solução aquosa de Azul de Trypan. As suspensões celulares foram analisadas em câmara de Neubauer, tendo-se o cuidado de realizar a contagem de células tumorais e a viabilidade celular. A viabilidade celular de eritrócitos também foi realizada.

#### **4.2.5 Contagem de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal**

Realizou-se esfregaço de 200uL do lavado peritoneal, corados com Giemsa 5%. Posteriormente realizou-se a contagem diferencial de leucócitos mono e polimorfonucleares, tendo-se o cuidado de avaliar um total de 100 células por lâmina

em campos microscópicos não coincidentes, chegando ao percentual relativo de cada tipo de celular inflamatório pesquisado.

#### **4.2.6 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue Periférico de Roedores**

O teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores foi baseado em Salvadori, Ribeiro e Fenech (2003), que é um teste que consiste em avaliar e/ou detectar danos causados ao aparelho mitótico ou cromossomo, normalmente realizado em células de medula óssea ou sangue periférico de roedores. Este teste tem como objetivo identificar os danos que resultam na formação de micronúcleos, sendo fragmentos ou cromossomos inteiros.

Após eutanásia do animal, a pele que cobre a perna foi cortada e retirou-se o fêmur. A extremidade final proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula. Com a agulha de uma seringa de 1mL, previamente preenchida com soro fetal bovino, foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o soro, de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo cônico, previamente marcado com o código do animal. A suspensão celular foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000rpm, e o sobrenadante descartado com o auxílio da pipeta de Pasteur. Com esse material foram realizados os esfregaços de medula óssea. Esfregaços de sangue periférico também foram realizados.

Após a secagem em temperatura ambiente, as preparações foram coradas com corante hematológico de Leishman (1,5g Leishman-azul de metileno, diluído em 1000 mL de metanol) por 3 minutos, posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba com corante de Leishman, diluído em água destilada na proporção 1:6 por 15 minutos. Após esse tempo, foram lavadas em água corrente.

A análise das lâminas foi realizada com a utilização do microscópio de luz, contando de 2000 eritrócitos policromáticos (medula óssea) e normocromáticos (sangue periférico) contabilizando-se as células micronucleadas por animal.

#### **4.2.7 Teste do Cometa**

O teste do cometa foi realizado de acordo com a técnica descrita por Singh et al. (1988) e Klaude et al. (1996), com modificações. Este teste consiste em detectar

quebras de cadeias de DNA, em células ou núcleos isolados, em diferentes tecidos de animais (comumente utilizado para detectar danos no material genético de roedores). O teste de cometa pode identificar ruptura de cadeias simples e duplas de DNA, se trata então de um teste de genotoxicidade, porém os danos identificados neste teste são danos reparáveis, que através dos ciclos da célula, o mecanismo de reparo do organismo pode fazer com que as células não sejam encaminhadas à apoptose.

A) Em um microtubo, 10 µL de suspensão celular de tumor ascítico de Ehrlich foram misturados a 120 µL de agarose LMP (*low melting point*) 5%, a 37 °C.

B) Em outro microtubo, 10 µL de sangue total, colhido da cavidade abdominal, foi misturado a 120 µL de agarose LMP 5%, a 37 °C.

Ambas as misturas, foram depositadas cada uma sobre lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal 1,5% e, em seguida, cobertas com lamínula. Após, foram levadas para refrigeração a 4°C, por 10 minutos, para endurecimento da agarose. Posteriormente, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas acondicionadas na solução de lise (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 10.0-10.5], N-lauroil-sarcosinato, 1% Triton X-100, 10% DMSO), em refrigerador (4° C), durante 10 dias. Após o período de lise celular, as lâminas foram acondicionadas em uma cuba horizontal de eletroforese (mergulhada em um recipiente com gelo) e cobertas com tampão alcalino (200 mM EDTA, 10N NaOH) para desnaturação por 20 minutos. A eletroforese ocorreu a 25 volts e 300 miliampère, por 20 minutos. Após eletroforese, as lâminas foram lavadas em 5 mL de tampão de neutralização (0,4 M Tris), durante 5 minutos. As lâminas foram fixadas em metanol, por 5 minutos, e acondicionadas em geladeira para posterior coloração e análise.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio (20µg/mL) e cobertas com lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 515 - 560 nm e filtro de barreira de 590 nm; aumento de 400x), contando-se 150 células por tratamento (foram montadas duas lâminas por animal, contando-se a primeira lâmina e se necessário procedia-se com a contagem da segunda), sendo classificadas de acordo com a cos. intensidade da cauda, em: 0 - sem dano; 1 - dano pequeno; 2 - dano médio; e 3 - dano máximo; 4 - apoptótico. Após as análises microscópicas, foi determinado o escore, isto é, somatório do número de células identificadas em cada classe vezes o valor da classe (Figura 4).

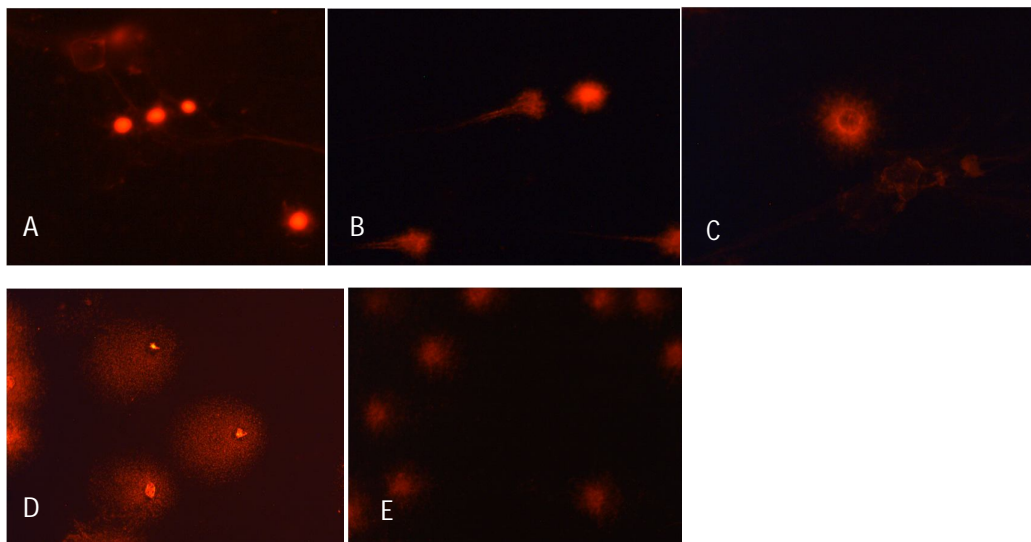


Figura 4: Imagem de células tumorais (C, D e E) e sangue periférico (A e B), submetidas ao teste do cometa. Classes de danos. A: classe 0; B: classe 1; C: classe 2; D: classe 3; E: classe 4, apoptótico.

Aumento 400x

Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.3 Análise Estatística

A análise estatística descritiva dos dados e as comparações entre os grupos foram realizadas por estaticista institucional, seguindo critérios de normalidade, considerando resultados estatisticamente significantes com  $p \leq 0,05$ . O acompanhamento da massa dos animais foi realizado pelo Friedman (Teste não paramétrico). Análise da progressão tumoral foi analisada pelo Teste Kruskall-Wallis e Teste t-Student, bicaudal e pareado. Para verificação de viabilidade celular, os testes foram Mann Whitney e Teste Miller. Para a análise de coloração diferencial de leucócitos, foi realizado o Teste Mann-Whitney e Teste t-Student. Nas análises de micronúcleo e Teste do Cometa realizou-se o Teste t-Student, bicaudal e pareado.

## 5 Resultados e Discussão

Os camundongos dos grupos experimentais foram pesados nos dias 0 (antes do início dos tratamentos), dia 7 (antes do inóculo do tumor) e dia 15, (antes da eutanásia), indicando que os diferentes horários de administração dos extratos não interferiram no ganho de massa desses animais, todavia quando administrado na fase clara, EELA promoveu a perda de massa após o inóculo do tumor (diferença entre pesagem dia 7 e dia 15), enquanto que na fase escura, camundongos tratados com EELA e EMLA apresentaram ganho de massa após o inóculo do tumor (Tabela 1). Aumento gradativamente significativo de massa foi observado no grupo EMLA, indicando que mesmo após o inóculo do tumor, os animais apresentaram uma melhora no quadro clínico e estado fisiológico. Hatano (2012) comprovou a atividade ansiolítica de óleo essencial de *L. alba* em ratos Wistar, devido à carvona, o principal responsável por uma ação tranquilizante, sugerindo que a redução do estresse desses animais que receberam os extratos de *Lippia alba*, que pode estar relacionada a melhora no quadro clínico dos mesmos.

Tabela 1 – Acompanhamento do ganho de massa (g) de camundongos swiss adultos machos no período de administração dos extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L, em diferentes fases do dia.

Tratamentos	Dia 0		Dia 7		Dia 15		Dia 15		Dia 15		Dia 15	
	Fase Clara <sup>ns</sup>		Fase Escura <sup>ns</sup>		Fase Clara <sup>ns</sup>		Fase Escura <sup>ns</sup>		Fase Clara <sup>ns</sup>		Fase Escura <sup>ns</sup>	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM	n	Média ± DM
Controle (Água)	5	35,4 ± 1,614	5	35,2 ± 2,004	5	35,8 ± 2,211	5	35,3±1,742	5	35,6 ± 2,21	5	37,1 ± 2,357
CT (Água)	5	33,1± 2,892	5	30,4 ± 1,872	5	34,9± 2,79	5	31,2 ± 2,412	5	33,7 ± 2,026	4	32,0 ± 0,903
EELA + Tumor	5	34,0 ± 0,998 <sup>a,b</sup>	5	34,7 ± 2,365 <sup>a</sup>	5	34,9 ± 2,047 <sup>a</sup>	5	35,2 ± 2,702 <sup>a,b</sup>	5	33,5 ± 1,975 <sup>b</sup>	5	37,1 ± 3,114 <sup>b</sup>
EMLA + Tumor	5	30,3 ± 1,011 <sup>a</sup>	5	33,3 ± 2,261 <sup>a</sup>	5	31,1 ± 0,737 <sup>a</sup>	5	33,8 ± 2,456 <sup>a,b</sup>	5	31,1 ± 1,494 <sup>a</sup>	5	35,0 ± 2,242 <sup>b</sup>

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. Teste não paramétrico de Friedman; <sup>ns</sup> tratamentos não apresentam diferença estatisticamente significativa entre as fases clara e escura ( $p>0,05$ ), <sup>a, b</sup> tratamentos diferem entre as datas de pesagem ( $p<0,05$ ).



Para análise de progressão tumoral foi realizada a contagem de células tumorais obtidas do lavado peritoneal em câmara de Neubauer. Os resultados (Média  $\pm$  Desvio-médio) indicam que a administração de EELA ( $5,57 \times 10^6 \pm 1,52 \times 10^6$ ) e EMLA ( $3,54 \times 10^6 \pm 3,04 \times 10^6$ ) na fase clara não são estatisticamente diferente do grupo controle tumoral ( $4,34 \times 10^6 \pm 3,89 \times 10^6$ ), ou seja, não foi identificada inibição ou indução de progressão tumoral. Entretanto, quando os tratamentos foram realizados na fase escura, os extratos testados inibiram a progressão tumoral (CT =  $1,53 \times 10^7 \pm 6,38 \times 10^6$ ; EELA =  $3,19 \times 10^6 \pm 2,09 \times 10^6$ ; 5,99  $\times 10^6 \pm 2,28 \times 10^6$ ). O único extrato que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre a administração nas fases clara e escura foi o grupo tratados com EMLA (Figura 5). Kalita (2011) observou propriedades anticancerígenas de uma planta (*L. camera*) da mesma família de *Lippia alba*, mostrando o potencial de diminuição e até indução à apoptose de células tumorais por componentes fenólicos presentes em plantas de *Lippia*.

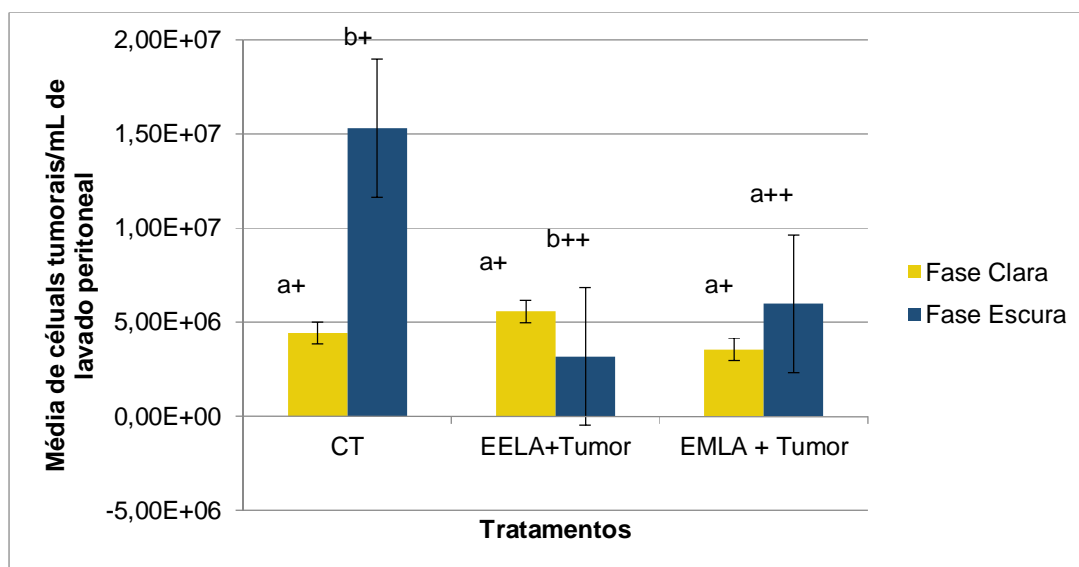


Figura 5: Avaliação da progressão tumoral em animais tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L, em diferentes fases do ciclo circadiano, pela contagem de células tumorais de lavado peritoneal, em câmara de Neubauer. CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. <sup>a,b</sup> Teste não paramétrico de Kruskal Wallis; tratamentos seguidos de letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significante entre fase clara e fase escura ( $p < 0,05$ ). <sup>+ ++</sup> Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, tratamentos seguidos de símbolos diferentes, apresentam diferença estatisticamente significante na mesma fase de administração do extrato ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelas autoras.

A partir dos resultados obtidos pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, pode-se verificar que todos os tratamentos foram viáveis, tanto em eritrócitos (> 97%) (Tabela 2) quanto em células tumorais de lavado peritoneal (> 90%) (Tabela 3), sendo que apenas os grupos de controle tumoral apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as fases para viabilidade de eritrócitos. Os extratos de LA elevaram a viabilidade celular de células tumorais na fase clara; na fase escura, apenas EMLA apresentou viabilidade maior que o controle tumoral, porém Xavier em 2011, constatou que, no óleo essencial de *Lippia microphylla*, que é do mesmo gênero de *L. alba* apresenta atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* com uma toxicidade moderada, não representando um fator limitante para que *L. microphylla* seja usada para fins terapêuticos, mas é constatado também que as alterações de *L. microphylla* são consideradas reversíveis comparando com as alterações causadas por diversos antineoplásicos que são largamente utilizados na clínica médica, mostrando que muitos estudos devem ser feitos a cerca de *L. alba* e seus óleos essenciais, tendo em vista sobre o que é encontrado na literatura.

Tabela 2 - Viabilidade celular de eritrócitos de sangue periférico, de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L em diferentes fases do dia, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan

Tratamentos	Fase Clara		Fase Escura	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM
Controle (Água)	5	98,235 ± 3,946 <sup>ns, a</sup>	5	100,00 ± 0,000 <sup>ns, a</sup>
CT (Água)	5	99,986 ± 0,029 <sup>*, a</sup>	4	97,866 ± 0,973 <sup>*, b</sup>
EELA + Tumor	5	100,0 ± 0,000 <sup>ns, a</sup>	5	99,853 ± 0,329 <sup>ns, a</sup>
EMLA + Tumor	5	100,0 ± 0,000 <sup>ns, a</sup>	5	99,933 ± 0,108 <sup>ns, a</sup>

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por \* na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre fase clara e fase escura (p<0,05).<sup>ns</sup>, não há diferença estatisticamente significativa (p>0,05). Teste Miller para comparações individuais, <sup>a, b</sup> tratamentos seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 3 - Viabilidade de células tumorais de lavado peritoneal, de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L em diferentes fases do dia, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan

Tratamentos	Fase Clara		Fase Escura	
	n	Média ± DM	n	Média ± DM
CT (Água)	5	90,415 ± 15,678 <sup>ns, a</sup>	4	97,780 ± 0,954 <sup>ns, a</sup>
EELA + Tumor	5	98,437 ± 1,662 <sup>ns, b</sup>	5	97,775 ± 1,920 <sup>ns, a</sup>
EMLA + Tumor	5	98,289 ± 1,010 <sup>ns, b</sup>	5	99,064 ± 0,668 <sup>ns, b</sup>

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por \* na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre fase clara e fase escura ( $p < 0,05$ ). <sup>ns</sup>, não há diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Teste Miller para comparações individuais, <sup>a, b</sup> tratamentos seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

A figura 6 estabelece uma comparação visual entre a viabilidade de eritrócitos e células tumorais, para o mesmo tratamento em relação à fase de administração. A análise desta figura indica que a viabilidade de eritrócitos foi maior do que a de células tumorais em todos os tratamentos em ambas fases de administração, entretanto, na fase clara, os extratos apresentam maior potencial de citotoxicidade seletiva, visto que a diferença entre viabilidade de eritrócitos e células tumorais se destaca nesta fase de administração. De acordo com Izu (2011) a desregulação do ritmo circadiano pode ser um fator de risco na carcinogênese, já que pode haver alterações entre os fatores promotores e inibidores da divisão celular. Maganhin (2008) disserta à respeito de uma glândula que está diretamente ligada ao ciclo claro-escuro, que possui participação na organização temporal dos ritmos biológicos, assim como a regulação do sistema imunológico, permitindo estabelecer relação com a atividade antitumoral e tumoricida dos extratos com a citotoxicidade seletiva que é observada na fase clara do atual trabalho.

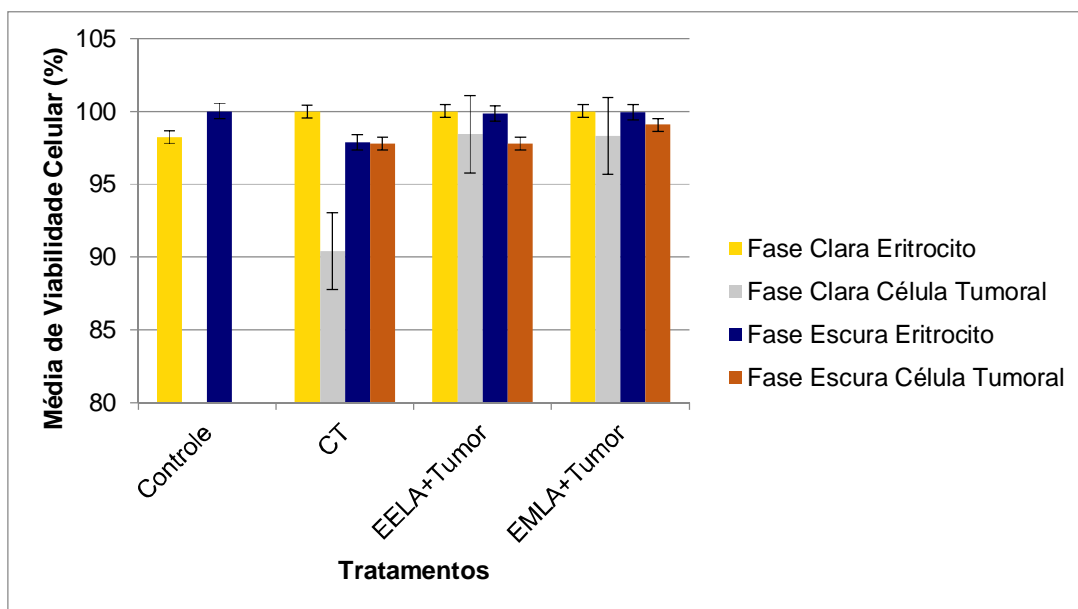


Figura 6: Comparação entre viabilidade celular de eritrócitos e células tumorais. CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias)

O infiltrado inflamatório dos animais tratados com os extratos em fase escura apresentou aumento de macrófagos e diminuição de linfócitos. Comparações com os grupos controle tumoral mostram que EELA reduziu o número de eosinófilos no infiltrado inflamatório quando administrado em fase clara; EMLA elevou o número de linfócitos, reduziu o número de macrófagos e eosinófilos, quando administrado em fase clara; a administração em fase escura aumentou a porcentagem de eosinófilos (Tabela 4).

As frequências de eritrócitos policromáticos com micronúcleo (PCEMN) (Tabela 5), obtidos de medula óssea e de eritrócitos normocromáticos micronucleados (NMEMN) (Tabela 6) obtidos de sangue periférico não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as fases de administração dos extratos. Quando administrados na fase clara, os extratos alcoólicos de LA não reduziram a taxa de mutações induzidas pelo tumor, em PCEMN. A administração durante a fase escura resultou no aumento da frequência de PCEMN, sugerindo atividade mutagênica e ou aneugênica destes extratos (Tabela 6).

Tabela 4 - Avaliação da atividade inflamatória de extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L, administrados em diferentes fases do dia, obtidas por coloração diferencial de leucócitos em esfregaço de lavado peritoneal.

Tratamentos	Fase Clara					Fase Escura				
	n	Tipo Celular (Média ± DM)				n	Tipo Celular (Média ± DM)			
		Macrófagos	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos		Macrófagos	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos
Controle (Água)	5	29,2 ± 6,378 ns, a	26,7 ± 11,031 ns, a, b	44,0 ± 11,229 ns, a	0 ns, a	0	Baixa celularidade <sup>ns, a</sup>			
CT (Água)	5	26,0 ± 9,899 ns, a	15,0 ± 10,606 ns, a	42,0 ± 11,313 ns, a	17,0 ± 12,020 ns, b	1	38 <sup>ns, b</sup>	30 <sup>ns, b</sup>	32 <sup>ns, b</sup>	0 <sup>ns, b</sup>
EELA + Tumor	4	16,0 ± 16,040 *, a	19,2 ± 11,819 ns, a	62,4 ± 1,414 *, a	2,0 ± 1,414 ns, b	5	39,2 ± 9,230 *, b	34,0 ± 16,970 ns; a, b	24,8 ± 2,828 *, b	2,0 ± 2,828 ns, a, b
EMLA + Tumor	5	9,3 ± 5,759 *, b	5,8 ± 18,653 *, a	71,2 ± 0,8165 *, b	0,7 ± 0,816 ns, c	5	36,8 ± 9,230 *, b	38,6 ± 17,326 *, b	21,8 ± 3,033 *, b	2,8 ± 3,033 ns, a, b

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); n, número amostral; DM, desvio-padrão. Teste de Mann Whitney; tratamentos seguidos por \* apresentam diferença estatisticamente significativa entre fase clara e fase escura ( $p < 0,05$ ); <sup>ns</sup>, não há diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). <sup>a, b, c</sup> Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna

Tabela 5 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *L. alba* L em diferentes fases do dia e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7<sup>o</sup> dia de tratamento.

Tratamentos	Fase Clara					Fase Escura				
	n	Razão PCE/NME	PCEMNs			n	Razão PCE/NME	PCEMNs		
			Média ± DM	Frequência (%)				Média ± DM	Frequência (%)	
				Média ± DM	Média ± DM				Total	Média ± DM
Controle (Água)	5	73,9 ± 71,7	13,2 ± 8,0 <sup>ns, a</sup>	2,0 ± 1,7	1,667	5	69,4 ± 32,2	18,6 ± 31,6 <sup>ns, a</sup>	1,7 ± 1,1	2,591
CT (Água)	5	179,0 ± 44,7	83,2 ± 49,9 <sup>ns, b</sup>	4,7 ± 2,6	4,604	4	120,1 ± 73,3	41,7 ± 41,8 <sup>ns, a</sup>	3,7 ± 1,5	4,488
EELA + Tumor	5	34,1 ± 6,7	82,4 ± 35,7 <sup>ns, b</sup>	4,1 ± 1,8	4,115	5	140,3 ± 80,9	64,2 ± 15,1 <sup>ns, b</sup>	3,2 ± 0,8	3,210
EMLA + Tumor	5	71,3 ± 73,8	81,2 ± 34,7 <sup>ns, b</sup>	4,0 ± 1,9	4,060	5	43,3 ± 21,5	80,0 ± 39,8 <sup>ns, b</sup>	4,0 ± 1,9	4,047

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba*; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); PCE, eritrócitos policromáticos; NME, eritrócitos normocromáticos; PCEMN, eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleo; DM, desvio-padrão; n, número amostral. Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, <sup>ns</sup> não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; <sup>\*</sup> há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; <sup>a,b,c</sup> Tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna ( $p < 0,05$ ). 2000 PCE/animal

A tabela 6 apresenta os resultados para o Teste do Micronúcleo em sangue periférico, indicando que EELA administrado na fase escura do metabolismo e EMLA administrado tanto na fase clara quanto na fase escura aumentam significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos, sugerindo atividade mutagênica dos mesmos, em células de sangue periférico.

Os extratos foram genotóxicos para as células tumorais, quando administrados na fase escura, que segundo Góes (2011), os roedores possuem uma taxa metabólica basal bem alta em seu período ativo (noturno), sugerindo que a rápida metabolização dos extratos, foi genotóxico para as células tumorais, já que foi observada uma alta frequência de danos classes 3 e 4, direcionando essas células para apoptose (Tabela 7). Em fase clara, genotoxicidade não foi observada.

Em leucócitos de sangue periférico, os extratos de LA aumentaram a frequência de danos quando administrados em fase clara, indicando atividade genotóxica dos mesmos. Entretanto, quando administrados em fase escura, atividade genotóxica não foi identificada (Tabela 8) mostrando a seletividade dos extratos durante o período ativo dos animais; enquanto os extratos eram administrados, já eram metabolizados. O que não ocorre nas fases claras, onde o extrato é administrado durante o período de vigília do animal, sugerindo a menor eficácia do extrato como imunomodulador, uma vez que os animais recebiam os extratos e logo depois entravam em repouso.

Tabela 6 - Frequência de eritrócitos normocromáticos micronucleados (NMEMNs) em sangue periférico de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *L. alba* L em diferentes fases do dia e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7<sup>o</sup> dia de tratamento.

Tratamentos	Fase Clara				Fase Escura			
	n	PCEMNs			n	PCEMNs		
		Média ± DM	Frequência (%)			Média ± DM	Frequência (%)	
			Média ± DM	Total			Média ± DM	Total
Controle (Água)	5	12,8 ± 6,3 <sup>ns, a</sup>	1,3 ± 0,6	1,280	5	7,2 ± 3,9 <sup>ns, a</sup>	0,7 ± 0,4	0,720
CT (Água)	5	14,6 ± 7,0 <sup>ns, a</sup>	1,4 ± 0,7	1,449	4	10,1 ± 3,3 <sup>ns, b</sup>	1,0 ± 0,3	1,007
EELA + Tumor	5	19,2 ± 4,4 <sup>ns, a</sup>	1,9 ± 0,4	1,940	5	17,0 ± 5,0 <sup>ns, c</sup>	1,7 ± 0,5	3,012
EMLA + Tumor	5	30,2 ± 8,7 <sup>ns, b</sup>	3,0 ± 0,9	1,699	5	25,2 ± 8,3 <sup>ns, c</sup>	2,5 ± 0,8	2,520

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); PCE, eritrócitos policromáticos; NME, eritrócitos normocromáticos; PCEMN, eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleo; DM, desvio-padrão; n, número amostral. Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, <sup>ns</sup>, não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; \* há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as salas; <sup>a,b,c</sup> Tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa, na mesma coluna (p<0,05). 1000 NME/animal



Tabela 7 - Frequência de danos em células tumorais, obtidas de lavado peritoneal de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba*, em diferentes fases do dia, e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7º dia de tratamento.

Tratamentos	Fase	n	Células com danos						
			Total	Classes (Média ± DM)					Score (Média ± DM)
				0	1	2	3	4	
CT (Água)	Clara*	5	494 <sup>a</sup>	58,4 ± 29,7	52,0 ± 6,9	24,0 ± 13,4	16,4 ± 12,6	6,4 ± 7,1	174,8 ± 48,9
	Escura*	4	199 <sup>+</sup>	43,0 ± 23,9	18,5 ± 8,6	14,3 ± 5,4	7,0 ± 6,4	0	68 ± 33,4
EELA+Tumor	Clara <sup>ns</sup>	5	632 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,5	29,2 ± 41,7	7,2 ± 6,8	17,2 ± 19,6	72,8 ± 59,1	386,4 ± 223,8
	Escura <sup>ns</sup>	5	743 <sup>++</sup>	7,2 ± 6,9	15,8 ± 7,5	32,2 ± 10,0	32,2 ± 12,6	70,4 ± 19,1	454,4 ± 47,9
EMLA+ Tumor	Clara <sup>ns</sup>	5	606 <sup>a</sup>	9,2 ± 7,3	22,8 ± 16,6	36,0 ± 11,6	36,8 ± 12,4	25,6 ± 30,2	307,7 ± 131,5
	Escura <sup>ns</sup>	5	733 <sup>++</sup>	3,6 ± 6,1	14,4 ± 10,8	18,0 ± 11,7	37,4 ± 22,9	76,8 ± 43,1	469,8 ± 78,6

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); DM, desvio-padrão. Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, <sup>ns</sup> não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamento entre as fases; \* há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamento entre as fases; <sup>a,b</sup> tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase clara; <sup>+, ++</sup> tratamentos seguidos por símbolos diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase escura. 150 células tumorais/animal.

Tabela 8: Frequência de danos em leucócitos, obtidas de sangue periférico de camundongos tratados com extratos metanólicos e etanólicos de *Lippia alba* L, em diferentes fases do dia, e inoculados com Tumor de Ehrlich no 7º dia de tratamento.

Tratamentos	Fase	n	Células com Danos						
			Total	Classes (Média ± DM)					Score Média ± DM
				0	1	2	3	4	
Controle (Água)	Clara	5	71,67 <sup>a</sup>	67,3 ± 43,9	12,0 ± 9,2	1,3 ± 0,4	0,7 ± 0,8	0,3 ± 0,4	18,0 ± 11,8
	Escura	5	580 <sup>+</sup>	25,3 ± 17,7	104,5 ± 17,4	10,7 ± 8,4	0,7 ± 1,3	0	128,3 ± 35,7
CT (Água)	Clara <sup>ns</sup>	5	247,5 <sup>b</sup>	72,0 ± 36,5	39,3 ± 20,9	8,3 ± 12,6	1,5 ± 2,6	0,5 ± 0,9	62,3 ± 47,6
	Escura <sup>ns</sup>	4	202,5 <sup>++</sup>	24,8 ± 21,6	33,7 ± 18,8	5,7 ± 8,8	0,7 ± 1,3	0,3 ± 0,4	48,5 ± 39,6
EELA + tumor	Clara <sup>ns</sup>	5	731 <sup>c</sup>	6,2 ± 13,8	22,4 ± 28,1	21,0 ± 19,6	14,4 ± 16,4	88,4 ± 61,3	461,2 ± 160,8
	Escura <sup>ns</sup>	5	510 <sup>+</sup>	6,8 ± 19,1	48,0 ± 9,5	26,8 ± 10,8	18,8 ± 9,2	8,4 ± 6,6	191,6 ± 45,5
EMLA + Tumor	Clara	5	679 <sup>c</sup>	13,0 ± 6,0	33,8 ± 7,4	43,0 ± 16,6	39,3 ± 12,5	19,8 ± 5,8	316,5 ± 36,2
	Escura	5	478 <sup>+</sup>	16,3 ± 7,1	27,3 ± 7,9	37,0 ± 16,6	20,0 ± 3,1	11,3 ± 7,3	206,7 ± 77,6

CT, controle tumoral; LA, *Lippia alba* L; EE, extrato etanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); EM, extrato metanólico (100 mg/Kg/dia durante 14 dias); DM, desvio-padrão. Teste *t-Student*, bicaudal, pareado, <sup>ns</sup> não há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; <sup>+</sup> há diferença estatisticamente significativa do mesmo tratamentos entre as fases; <sup>a,b</sup> tratamentos seguidos por letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase clara; <sup>++</sup> tratamentos seguidos por símbolos diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa na fase escura. 150 células tumorais/animal

## 6 Considerações Finais

Os extratos alcoólicos de *Lippia alba* não interferiram no ganho de massa dos animais, independente da fase de administração dos mesmos.

Quando administrados em fase de metabolismo ativo (fase escura) os extratos inibem a progressão tumoral.

A viabilidade de eritrócitos é maior do que a de células tumorais, entretanto os extratos aumentam a viabilidade de células tumorais.

Sugere-se que os extratos alcoólicos de *Lippia alba* possam apresentar atividade imunomodulatória devido ao aumento significativo na população de linfócitos.

Os extratos apresentam atividade mutagênica e/ou aneugênica em células de medula óssea, quando administrados em fase escura. Em células de sangue periférico, essa atividade é encontrada nas duas fases de administração.

A atividade genotóxica foi observada em fase escura, direcionando as células tumorais à apoptose, entretanto, foram genotóxicos à células de sangue periférico, quando administrados na fase clara.

Os extratos também podem estar associados à atividade tumoricida, pois os dados de cometa sugerem um aumento de danos de classe 4, com alta frequência de células apoptóticas. Entretanto, os extratos também atingiram células sanguíneas, sugerindo que a utilização dos mesmos deve ser cautelosa.

Nos tratamentos houve um aumento de resposta inflamatória, indicado pelo aumento de linfócitos no líquido ascítico.

De acordo com as comparações dos resultados entre as salas de fase de repouso e fase metabólica ativa, é recomendado que os extratos sejam administrados em fase ativa, onde observou-se inibição da progressão tumoral e encaminhamento de células tumorais a apoptose, entretanto, sugere-se cautela, visto que estes extratos também causaram danos em células normais.

## Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de fitoterápicos Farmacopéia Brasileira**. 1 ed. (2011). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf)> Acesso em: 12 fev 2014

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso Brasileiro, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

CARVALHO, N. C. de 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.

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.ccs.uel.br/espacoparasaude/v6n2/plantamedicinal.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2014.

DAGLI, M. I. Z; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. Na experimental study on lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 97-103, 1992.

DIJOUX, N. et al. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. **Toxicology in Vitro**, England, v. 20, n. 4, p. 480-489, jun. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.018>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. **Berlinger Klinischer Ocheschrift**, v. 28, p. 871-874, 1906.

ESTEVEs, G.A. Ansiedade e estresse na modernidade. Artigonal, Diretório de Artigos Gratuitos, 2009. Acesso em: 10 de maio 2014. Disponível em: <<http://www.artigonal.com/medicina-artigos/ansiedade-e-estresse-na-modernidade-1176263.html>>. Acesso: 16 mar. 2014.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 294 p.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, p. 125-132, 1990.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81 – 95, 2000.

GARRIOT, M.L.; PHELPS, J.B.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.517, p. 123-134, 2002.

GÓES, Mariana Bentim. Síndrome do comportamento em roedores muroides da Reserva Florestal do Morro Grande e suas possíveis implicações: resposta à fragmentação, dinâmica sucessional e taxa metabólica basal. 2011. 39 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Educação física) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/119276>>.

GUERRA, M. et. al. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80 porciento de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (caña santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Cuba, v. 5, n. 3, p. 97-101, set.-dez. 2000. Disponível em:

<<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=295511&indexSearch=ID>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

HATANO, V.Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Braz J Med Biol Res**, March 2012, Volume 45(3) 238-243.

HENDERSON, D. S. ed. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, 113: 203-211, 1999.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação no Brasil. **Acta Cir. Bras.**, v. 14, 2002.

Izu, M. et al. Night work as a risk factor in carcinogenesis. **Cienc. Enferm**; 17(3):83-95, dez. 2011. Tab.

JEZLER, C. N. et al. *Lippia alba* morphotypes cidreira and melissa exhibit significant differences in leaf characteristics and essential oil profile. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/2013nahead/aop00313.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

Kalita et al. Phytochemical Composition and In Vitro Hemolytic Activity of Lantana Camara L. (Verbenaceae) Leaves. Molecular and Microbiology Research Laboratory, Environmental Biotechnology Division, School of Bio Sciences and Technology, VIT University, Vellore, Tamil Nadu - 632 014, India. **Pharmacologyonline**, 1: 59-67 (2011).

KLAUDE, M., et al. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, 363: 89-96, 1996.

KOBAYASHI, H et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, n. 2, p. 103- 115, 1995.

LIN, S.Y.; KAWASHIMA, Y. Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems. *Journal of controlled release*, v. 157, n. 3, p. 331-353, 2012

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology, Bucaramanga**, v. 34, n. 3, p. 479-488, jul-set.2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3168191/pdf/gmb-34-3-479.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

MANGANHIN, C.C. et al, Melatonin effects on the female genital system: a brief review. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.54 no.3 São Paulo May/June 2008.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2.ed. Fortaleza: UFC, 2000. 346p.

MEIRA, M. R.; SOUZA, S. A. M.; MARTINS, E. R. Plantas medicinais, produção e cultivo de *Melissa officinalis* no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1-11, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/plantas.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

MENEZES, Elizabeth Gomes Paulino. Avaliação da atividade citotóxica e indutora de apoptose da grandisina em células leucêmicas K-562 com fenótipo de resistência a fármacos. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 878-884,

set. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n6/10.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 80-92, 2007.

PORTALUPI, F., TOUITOU Y, SMOLENSKY, M.H., Ethical and Methodological Standarts for Laboratory and Medical Biological Rhythm Research. *Chronobiology International: The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*. July 7, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/07420520802544530>

PUATANACHOKCHAI, R. et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 183, n. 1, p. 9-15, set. 2002.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, 2003, p. 173 – 220; p.247 -271.

RIGOTTI, M. Farmácia Verde: Resgate da Sabedoria Popular. Projeto “A cura pelas plantas”, p. 3-5, 2010. Disponível em: <<http://www.curaplantas.xpg.com.br/farmacieverde.PDF>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

SALVADORI, D. M.F.; RIBEIRO L. R.; NATARAJAN, A.T.The anticlastogenicity of b-carotene evaluated on human hepatoma cells. **Mutation Reserach**, n. 303, p. 151-156, 1993.

SARAYDIN, S. U. et al. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast câncerin vitro and in vivo. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Sivas, 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](http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume13_No6/2765-70%205.19%20Serpil%20Saraydin.pdf)>. Acesso em: 09 mar. 2014.



SENSITIVE Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2001.

SILVA, N.A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.] cultivada no sul da Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.52-5, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. p.467-95.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Research**, 175: 184-191, 1988.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A. In: ZELNICK, R. D. et al. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from *Coleus barbatus* Benth. **Tetrahedron**, v. 33, 1457-1467, 1977.

Tavares, I. B. et al. *Lippia alba*: Chemical, pharmacological and agronomical studies. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* v.4, n.1, Jan/Abr (2011).

XAVIER, Aline Lira. Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. Cronobiologia: princípios e aplicações. Sao Paulo, SP: EDUSP; Editora Fio Cruz, 1997.

LEVI, Francis; SCHIBLER, Ueli. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 47, p. 593-628, 2007.

SÁNCHEZ, Merino, GIULLÉN, Gil. Revista Clínica Española. Volume 205, Issue 6, June 2005, Pages 283-286.

## ANEXO A – PARECER CEUA



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Bauru, 24 de abril de 2015  
CEUA N 8706290315

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marilanda Ferreira Bellini

Depto/Disc: Ciências Da Saúde

Pesquisadores envolvidos: Dulce Helena Constatino - colaborador (usc); Fernando Tozze Alves Neves - colaborador (usc); Rita Luiza Peruquetti - colaborador (usc); Wilson A Orcini - colaborador (usc);

Título do projeto: "Análises físico-químicas de *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Melissa officinalis*, avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade de seus extratos metanólicos e etanólicos, in vitro e in vivo. "

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais USC**

O uso de plantas medicinais cresce diariamente, à medida que a população busca alternativas naturais para o tratamento de doenças e melhoria na qualidade de vida. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Melissa officinalis* L. são as três espécies de erva-cidreira mais comumente empregadas na medicina popular brasileira. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar as propriedades físico-químicas de *C. citratus*, *L. alba* e *M. officinalis* – para verificar a pureza da matéria-prima vegetal – avaliar o potencial citotóxico e mutagênico de seus extratos etanólico e metanólico, in vitro e in vivo. O projeto está dividido em três etapas principais: a) Caracterização do material botânico, obtenção e caracterização dos extratos: Serão avaliados o percentual de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido no material botânico. Extratos etanólicos e metanólicos serão preparados utilizando folhas secas moídas de *C. citratus*, *L. alba* e partes aéreas secas moídas de *M. officinalis* (1:10 mL de água destilada), maceradas em agitador magnético, 29-30 °C, 4 horas. O volume do extrato será filtrado e o produto final será colocado em cápsula de porcelana, para secagem em capela. Os extratos serão diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para os testes in vitro e em água deionizada para os testes in vivo. Serão realizadas as análises de determinação de compostos fenólicos totais e Cromatografia em camada delgada para verificação da presença de citral nos extratos. b) Testes in vitro: serão realizadas análises de citotoxicidade pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan e mutagenicidade pelo teste de micronúcleo em células binucleadas e teste do cometa, em células de obtidas de tumor de Ehrlich; c) Testes in vivo: serão utilizados camundongos inoculados com Tumor ascítico de Ehrlich para análise citotoxicidade pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan, de mutagenicidade pelos testes de micronúcleo em células de medula óssea de roedores e teste de cometa, além da análise de crescimento do tumor. Ambos os testes, in vitro e in vivo, receberão os seguintes tratamentos/grupos experimentais:

- 1) Controle Negativo Saudável (animais saudáveis, sem Tumor de Ehrlich, sem administração de extratos);
  - 2) Controle Negativo Tumoral (animais com Tumor de Ehrlich, sem administração de extratos);
  - 3) Controle Positivo Tumoral (animais com Tumor de Ehrlich e com administração de agente indutor de danos);
  - 4) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *L. alba*;
  - 5) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *L. alba*;
  - 6) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *M. officinalis*;
  - 7) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *M. officinalis*;
  - 8) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Etanólico de *C. citratus*;
  - 9) Animais com Tumor de Ehrlich + administração de Extrato Metanólico de *C. citratus*.
- Desta forma, permitindo a comparação dos resultados em ambos os modelos experimentais.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração, na reunião de 16/04/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dulce Helena Jardim Constantino', written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 24<sup>th</sup> April 2015

## CERTIFIED

We certify that the Research "Physical and chemical analysis of *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* and *Melissa officinalis*, cytotoxicity and mutagenicity evaluation of its Methanol and ethanol extracts in vitro and in vivo.", protocol number CEUA 8706290315, utilizing 100 Heterogenics mice (100 males), under the responsibility Marilanda Ferreira Bellini, was approved in the meeting of day 04/16/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University.

Certificamos que o Projeto intitulado "Análises físico-químicas de *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* e *Melissa officinalis*, avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade de seus extratos metanólicos e etanólicos, in vitro e in vivo.", protocolado sob o CEUA nº 8706290315, utilizando 100 Camundongos heterogênicos (100 machos), sob a responsabilidade de Marilanda Ferreira Bellini, foi aprovado na reunião de 16/04/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração.

yours faithfully,



Dulce Helena Jardim Constantino  
Coordinator of the Ethics Committee on Animal Use  
Sagrado Coração University