

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ANA GABRIELLE SCARPIN PELLEGATTI

**ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCOÓLICOS
DE *Cymbopogon citratus*, EM LINFÓCITOS
HUMANOS**

BAURU
2015

ANA GABRIELLE SCARPIN PELLEGATTI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E
ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCOÓLICOS
DE *Cymbopogon citratus*, EM LINFÓCITOS
HUMANOS**

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

BAURU
2015

P386a	<p data-bbox="548 1388 943 1415">Pellegatti, Ana Gabrielle Scarpin</p> <p data-bbox="548 1457 1289 1612">Avaliação das atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcoólicos de <i>Cymbopogon citratus</i>, em linfócitos humanos / Ana Gabrielle Scarpin Pellegatti. -- 2015. 28f. : il.</p> <p data-bbox="586 1654 1198 1682">Orientadora: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini.</p> <p data-bbox="548 1724 1289 1814">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1856 1289 1942">1. Erva-cidreira. 2. <i>Cymbopogon citratus</i>. 3. Teste de aberração cromossômica. 4. Anticlastogenicidade. 5. Clastogenicidade. I. Bellini, Marilanda Ferreira. II. Título.</p>
-------	---

ANA GABRIELLE SCARPIN PELLEGATTI

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CLASTOGÊNICA E ANTICLASTOGÊNICA DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE *Cymbopogon citratus*, 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 Biomedicina, 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.

Dedico este trabalho à minha mãe,
ao meu pai, ao meu irmão e aos
meus avós que sempre sonharam
com este momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a nossa mãe Maria, que sempre me guiaram e me influenciaram para a escolha deste curso, e sempre me deram forças, capacidade e me iluminam para que eu nunca desistisse de chegar até aqui.

Aos meus pais, Marco e Durcelina, que sempre se esforçaram e me apoiaram para a conclusão dessa nova etapa na minha vida. Obrigado pela educação, conselhos, compreensão, carinho e amor incondicional.

Ao meu irmão, Marcos Henrique pela paciência, amizade, compreensão e ajuda indireta.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, com quem tive o imenso prazer de conviver, pelos ensinamentos, pela confiança, pela eficiência e por me orientar com tanta dedicação. Muito obrigado pela paciência.

A Bióloga Thaís Bernardes de Queiroz, por toda ajuda, pelo suporte, pela paciência, por ter dado início a este projeto e, principalmente, por ter me auxiliado em todos os momentos com tamanha prontidão e dedicação.

A Prof.^a Dra. Maricê Thereza Corrêa Domingues Heubel, Universidade do Sagrado Coração, por ter a confiança e a prestação de liberar o laboratório de Biociências para as análises das lâminas.

As técnicas do Laboratório de Biociências, Ligia Belmonte e Fabiane Bortoluci, por toda paciência, compreensão e suporte dado.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular, Wilson Orcini, por todo suporte dado.

Aos voluntários que aceitaram participar do projeto.

A todos os discentes do curso de Biomedicina, Universidade do Sagrado Coração, que estiveram comigo nesses longos anos de graduação. Em especial as minhas amigas Bruna Leticia Martins, Jessica Fernanda Herculano, Milena Mayumi Yamatsuka, que me ajudaram de forma indireta e direta, para a conclusão dessa graduação.

À Universidade do Sagrado Coração por todas as oportunidades que nos concedeu e pelo privilégio que tivemos em conviver com um Corpo Docente prestativo e dedicado aos seus discentes.

"Deus não escolhe os capacitados mais capacita os escolhidos. " (Autor Desconhecido)

RESUMO

Conhecida como erva cidreira, capim-limão, a *Cymbopogon citratus* é uma das plantas mais conhecidas e empregadas popularmente, pela sua facilidade de cultivo, além de ter diversas funções terapêuticas, possui ainda efeitos comprovados cientificamente como sedativo, analgésico, excitante gástrico, antitérmico, antibacteriano e entre outros. Há relatos científicos que comprovam seus benefícios, entretanto, são poucos os estudos que mostram seus efeitos tóxicos. Assim o presente estudo teve como objetivo investigar o perfil clastogênico e anticlastogênico de extratos alcóolicos de *Cymbopogon citratus*, através dos testes de viabilidade celular e aberração cromossômica em linfócitos humanos. Para tanto, foi coletado sangue periférico de 3 voluntários, e colocados em meio RPMI, juntamente com soro fetal bovino, fitohemaglutinina A e penicilina-estreptomicina, o qual foram incubados a 37°C por 48 horas. Após esse período foram realizados os tratamentos de clastogenicidade e anticlastogenicidade: controle negativo (30µL de DMSO – dimetilsulfóxido), controle positivo (metilmetanosulfonato – 1µg/mL de MMS), extrato etanólico de *C. citratus* (100µg/mL), extrato metanólico de *C. Citratus* (100µg/mL), extrato etanólico de *C. citratus* + MMS; extrato metanólico de *C. citratus* + MMS, por 24 horas. Duas horas antes do término dos tratamentos, 0,016% de colchicina foi adicionado as culturas para obtenção de células em metáfase. Para realização do teste de viabilidade celular, 10 uL da suspensão celular foi reservada. As lâminas para análise de aberrações cromossômicas foram preparadas por gotejamento, coradas com Giemsa a 8% e a análise foi realizada em microscópio de luz, com aumento final de 1000x, contando-se 100 metáfases/voluntário/tratamento. A viabilidade celular foi superior a 99% em todos os tratamentos, indicando inexistência de citotoxicidade dos extratos de *C. citratus* testados. de , em leucócitos humanos. As análises de aberrações cromossômicas não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), sugerindo que os extratos metanólicos e etanólicos de *C. citratus* não protegem e também não induzem danos aos o DNA.

Palavras-chave: Erva-cidreira. *Cymbopogon citratus*. Teste de aberração cromossômica. Anticlastogenicidade. Clastogenicidade.

ABSTRACT

Known as lemon balm, lemon grass, the *Cymbopogon citratus* is one of the best known plants and used popularly by its ease of cultivation, besides having several therapeutic functions, it also has proven effects scientifically as a sedative, analgesic, gastric exciting, antipyretic, antibacterial and among others. There are scientific reports that show its benefits, however, there are few studies that show its toxic effects. Thus the present study had to investigate the clastogenic and anticlastogênic profile of alcoholics extracts of *Cymbopogon citratus*, through the cell viability tests and chromosome aberration in human lymphocytes. For this purpose, peripheral blood was collected from three volunteers and placed in RPMI medium with fetal calf serum, phytohemagglutinin A and Penicillin-Streptomycin, which were incubated at 37 ° C for 48 hours. Thereafter were carried out treatments of clastogenicity and anticlastogenicity: negative control (30µL of DMSO - dimethyl sulfoxide), positive control (methyl methanesulfonate - 1µg / ml MMS), ethanol extract of *C. citratus* (100µg / mL), methanol extract of *C. citratus* (100µg / ml), ethanol extract of *C. citratus* + MMS; methanol extract of *C. citratus* + MMS for 24 hours. Two hours before the end of treatments, 0.016% of colchicine was added to the cultures to obtain cells in metaphase. To perform the cell viability test, the cell suspension was 10uL reserved. The slides for the analysis of chromosomal aberrations were prepared by drip, stained with Giemsa to 8% and the analysis was performed under light microscope, with a final magnification of 1000X, counting 100 metaphases / voluntary / treatment. Cell viability was greater than 99% in all treatments, indicating lack of cytotoxicity of the tested *C. citratus* extracts of human leukocytes. The analysis of chromosomal aberrations showed no statistically significant difference ($p > 0.05$), suggesting that methanol extracts and ethanol *C. citratus* do not protect, nor does it induce damage to DNA.

Keywords: Lemon balm. *Cymbopogon citratus*. Chromosomal aberration test. Anticlastogenicity. Clastogenicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. MEDICINA POPULAR.....	9
1.2. ERVA-CIDREIRA	9
1.3. <i>Cymbopogon citratus</i>	10
1.4. TOXICOLOGIA.....	11
1.5. MUTAGÊNESE	12
1.5.1. Aberrações cromossômicas	13
1.5.2. Erva-cidreira e genética toxicológica	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	16
3.2. MATERIAL BOTÂNICO.....	16
3.3. CULTURA CELULAR.....	17
3.4. AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA.....	17
3.5. TRATAMENTOS	18
3.6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	18
3.7. TESTE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	18
3.8. ÍNDICE MITÓTICO.....	19
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÃO	254
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEDICINA POPULAR

A população busca cada vez mais recursos naturais e mais econômicos para a cura, tratamento e prevenção de doenças, utilizando plantas e ervas medicinais, que estão gratuitamente à disposição na natureza; e muitas vezes, cultivadas nos fundos dos quintais. Esta é uma das práticas mais antiga da humanidade, buscando sempre a facilidade. (MARINHO, 2007).

Atualmente o Brasil apresenta um significativo crescimento de práticas utilizando plantas medicinais, pois tem favoráveis condições ambientais, além de possuir um terço da flora mundial. (YUNES, 1998; DI STASI, 2002). Entretanto, as pesquisas sobre o uso seguro e controle na comercialização dessas plantas, é iniciante, e não apresentam resultados concretos.

1.2. ERVA-CIDREIRA

Dentre os tipos de plantas medicinais e ervas, temos a erva cidreira, também conhecida como cidreira, citronela, capim-cidreira, capim-santo e melissa (COSTA et al, 2005). Essa erva pode ser usada de diversas maneiras como chás, macerada em compressa, banhos, aromatizantes culinários, tratamentos de feridas, insônia, calmante, desmaios, cefaleias, entre outros. São plantas subarborescentes, rizomatosas, que possuem um crescimento variável conforme as condições do solo e da luminosidade (CAPIM SANTO...,2009).

O odor de suas folhas é semelhante ao limão, contendo a presença de óleo volátil de evaporação média. Este por sua vez é composto por álcoois como citronelol, geraniol, linalol e ainda a presença de outros componentes como citral, neral, ácido fenol carboxílico, ácido citronélico, acetato geranílico cariofileno e taninos. Pode-se obter óleo essencial pelo processo de vaporização de ervas que são colhidas no início da floração (FRANCO; LEITE, 2004).

As plantas medicinais apresentam inúmeros constituintes em seus extratos, podem apresentar diferentes princípios ativos quando testados, sendo que, estes

princípios ocorrem devido a presença de compostos de classes e estruturas diferentes (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

1.3. *Cymbopogon citratus*

A espécie *Cymbopogon citratus* (D.C) é uma dentre tantas espécies de ervas-cidreira utilizadas na medicina popular. Pertencente a família Poaceae, é conhecida em diversas regiões do Brasil como capim-cidreira, capim-limão, capim-cheiroso, erva-cidreira, entre outros. Já em outras regiões do mundo é conhecida como *cymbopogonis* (latim), *citronnelle* (francês), *lemon grass* (inglês), *hierba limón* (espanhol) e *zitronengras* (alemão). (GOMES, 2003)

Tendo origem nas regiões tropical e semitropical da Ásia, esta erva se adaptou bem nas regiões da América do Sul, América do Norte, na África e ainda em outros continentes tropicais (LORENZI; MATOS, 2002). No Brasil, apresentou bom desenvolvimento em todas as regiões, mas não resiste a geadas; se isso ocorre rebrota na primavera (GOMES, 2001). No México, é usada como um sedativo (TORTORIELLO; ROMERO, 1992)

Possui longas folhas aromáticas, estreitas, agudas, ásperas e com nervura central proeminente (CRAVEIRO et al., 1981), coloração verde, podendo chegar a 1,2 metros de altura. (Figura 1).

Figura 1 - *Cymbopogon citratus*



Fonte: Google imagens

É uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, conhecido internacionalmente como óleo de *Lemongrass*, (óleo essencial de capim-limão). Este por sua vez, possui forte odor de limão e é largamente empregado como aromatizante em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes, porém, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, servindo de material de partida para síntese de importantes compostos, como iononas, metil-iononas e vitamina A (GUIMARES et al., 2008).

O óleo essencial de *C. citratus* é relatado por ter uma diversidade de atividades biológicas e é amplamente utilizado na medicina tradicional. No entanto, apesar desta ampla utilização, existem poucos estudos controlados que confirmam sua atividade biológica no Sistema Nervoso Central (COSTA et al., 2011).

Na Medicina popular, *C. citratus* é muito utilizada devido a sua ação calmínativa, comprovada por Blanco e colaboradores (2009) que trataram animais com 1,0 g/kg de óleo essencial de *C. citratus*; e por Costa e colaboradores (2011) os quais obtiveram resultados positivos em testes com camundongos suíços tratados com doses de 10 mg/kg, sugerindo que os efeitos ansiolíticos são mediados pelo sistema GABA, sendo eficaz contra a desordem de ansiedade generalizada e epilepsia nos procedimentos experimentais testados.

1.4. TOXICOLOGIA

Literatura sobre a toxicidade das plantas medicinais é escassa, gerando problemas de automedicação, já que não se conhece o perfil tóxico dessas. Desse modo, a grande preocupação com o uso desses medicamentos advém do fato de que seu uso indiscriminado, associado diretamente ao conceito de inocuidade, pode ser potencialmente tóxico ao organismo. (FONSECA; PEREIRA, 2004).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais. (VEIGA ; PINTO; MACIEL, 2005).

A toxicidade é relacionada com a detecção, composição química e ação biológica de substâncias tóxicas podem ser consideradas como a capacidade de ser prejudicial, causando dano grave ao organismo (BARROS; DAVINO, 2008)

1.5. MUTAGÊNESE

Os agentes causadores de mutações são conhecidos como agentes mutagênicos, onde apresentam capacidades de gerar mutações quando são expostos às células, ou seja, causam danos ao material genético, o DNA, o qual não sofre reparação no processo de replicação celular, passando assim de geração para geração celular. Estas mutações podem ser provocadas, por agentes físicos, químicos e biológicos. (MELDAU, 2006)

Estes agentes mutagênicos podem causar dois tipos diferenciados de danos no material genético: aberrações cromossômicas estruturais (clastogênicas); ou interferir no processo de formação do fuso mitótico (aneugênicas), provocando aneuploidias. Além desses tipos, entende-se genotoxicidade como qualquer dano causado à molécula de DNA. (RABELLO; RODRIGUES; MONTELEONE, 1991).

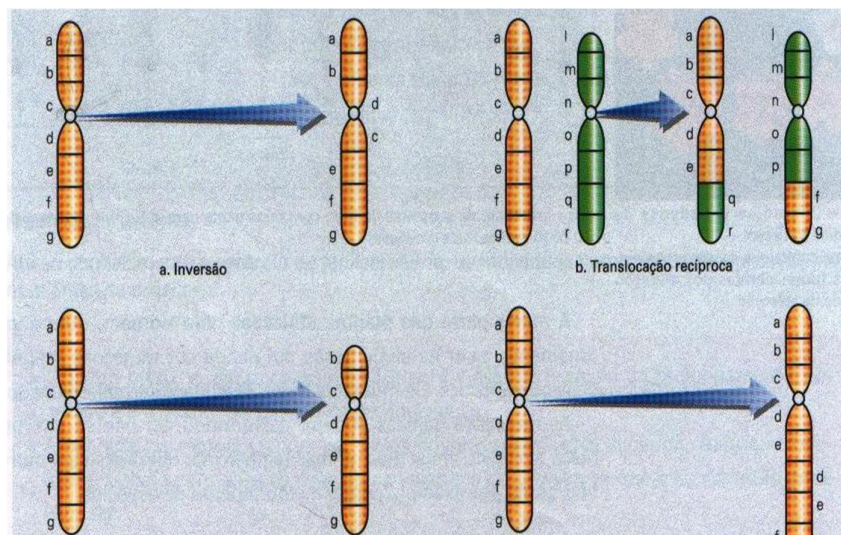
As mutações distinguem-se das aberrações por serem alterações a nível de ponto, envolvendo a eliminação ou substituição de um ou poucos nucleotídeos da fita de DNA. Fatores responsáveis por malformações congênitas, ou seja, por defeitos morfológicos ou funcionais que podem ser visíveis ao nascimento ou que podem manifestar-se posteriormente. Os agentes teratogênicos, como radiações, infecções maternas, consumo de álcool, nicotina, certos medicamentos e outras drogas atuam durante a gestação, isto é, na formação do novo ser vivo, produzindo anomalias. No entanto, só de uma parte das muitas malformações congênitas se identifica o fator responsável, pois muitas resultam de vários fatores em simultâneo, designando-se de multifatoriais, ou são de causa desconhecida. A carcinogênese consiste em um processo de alterações genéticas após contato celular com agentes físicos, químicos ou biológicos. Esta interação pode culminar em manifestações de fenótipos malignos celulares (CANISELLA, 2014).

1.5.1. Aberrações cromossômicas

Aberrações cromossômicas são alterações estruturais ou alterações numéricas nos cromossomos. As alterações estruturais são visíveis microscopicamente e podem ocorrer em um ou mais cromossomos, onde se envolve a perda, ganho ou inversões de segmentos, sendo classificadas em diferentes grupos: deleção, translocação, duplicação e inversão (Figura 2). Nas alterações numéricas ocorre o aumento ou a diminuição do número de cromossomos, alterando o cariótipo normal da espécie humana (46 pares de cromossomos) sendo classificadas em dois grandes grupos, euploidias e aneuploidias (FONSECA, 2015).

Figura 2 - Mutações cromossômicas estruturais:

a) inversão; b) translocação; c) deleção; d) duplicação.



Fonte: CASTILLO (2012)

A Figura 2, mostra na letra A inversão, onde os cromossomos sofrem uma quebra e uma rotação de 180° se invertendo no momento da soldagem, ocorrendo assim alterações da ordem dos genes e o pareamento dos cromossomos homólogos na meiose. Na letra B, observa-se uma translocação onde se trata de uma troca de segmentos entre cromossomos não homólogos, a translocação recíproca na qual ocorre uma troca em apenas um elemento de cada par. Já a letra C apresenta uma deleção, que pode ocorrer em um segmento do cromossomo, o qual será perdido na

próxima divisão celular. Por fim a letra D apresenta a duplicação onde há a formação de um segmento adicional em um dos cromossomos (CASTILLO, 2012)

Estas alterações ocorrem durante a interfase, fase do ciclo celular onde os cromossomos estão mais estendidos, com o metabolismo ativo e dispostos a variações do ambiente, o qual provoca rupturas nas suas estruturas. No entanto, devem ser analisadas utilizando uma microscopia de luz, em metáfase, fase do ciclo celular na qual o DNA esta altamente compactado, podendo assim ser observado na forma de cromossomo.

1.5.2. Erva-cidreira e genética toxicológica

A literatura apresenta alguns estudos com *Cymbopogon citratus*, mas são poucos os relatos de potenciais clastogênicos e anticlastogênicos. (LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011)

Em um estudo de farmacologia da *C. citratus*, foi feita a administração diária, por via oral, durante 2 meses, de uma infusão preparada a partir de folhas de *C. citratus* em ratos adultos, em doses maiores do que a dosagem correspondente estimada para humanos. Os ratos não apresentaram a indução de qualquer efeito tóxico, também foi observado o mesmo efeito em ratos machos e fêmeas e em sua prole, quando a infusão foi administrada antes do acasalamento ou durante a gestação. (FORMIGONI et al., 1986)

Recentemente, foi demonstrado que o citral inibe fortemente a atividade do complexo CYP2B60 hidroxilase, assim como a síntese de alfatoxinas B1, micotoxinas envolvidas na carcinogênese gástrica. O citral, a carvona e o limoneno têm mostrado propriedades protetoras *in vitro* e *in vivo*. (LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011).

Algumas plantas comumente utilizadas pela população podem apresentar atividades genotóxicas, torna-se oportuna a realização de pesquisas visando conhecer a genotoxicidade das mesmas, (FONSECA; PEREIRA, 2004), desta forma, é de extrema importância avaliar os efeitos genotóxicos de *Cymbopogon citratus*, pois é necessário manter a população informada sobre os efeitos causados por esta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades clastogênica e anticlastogênica de extratos alcóolicos de *Cymbopogon citratus* (D.C), *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a indução de aberrações cromossômicas, pelos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Cymbopogon citratus* (D.C), em cultura de linfócitos humanos;
- b) Observar o efeito anticlastogênico dos tratamentos com extratos etanólico e metanólico de *Cymbopogon citratus* (D.C), 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 6 indivíduos adultos e saudáveis, de ambos os sexos, que aceitaram participar do projeto, após esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), elaborado de acordo com a Resolução 466/12.

3.2. MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Cymbopogon citratus* (partes aéreas) foi obtido, já desidratado, da empresa Nutri Ervas Ind. e Com. Ltda Me - CNPJ: 06.050.815/0001-61. Os extratos metanólico e etanólico, utilizados neste trabalho, foram previamente preparados pela Bióloga Thais Bernardes de Queiroz, no Laboratório de Controle Físico-químico de Medicamentos, localizado na Universidade do Sagrado Coração (USC), na cidade de Bauru, estado de São Paulo, segundo Zelnick et. al. (1977), sob supervisão do Prof. Me. Fernando T. A. Neves, procedendo a mistura 100 g de planta desidratada com 1000 mL de álcool (etanol ou metanol). A extração dos princípios ativos foi feita por maceração em agitador magnético (Tecnal TE-0851), com velocidade em 90% e temperatura entre 29-30°C, durante 4 horas. O volume total do extrato foi filtrado com o auxílio de uma bomba de vácuo (Prismatec), e o produto final foi separado em cápsulas de porcelana, mantidas em capela com circulação de ar forçado, para secagem. Dentro da mesma, foi adicionada sílica em gel azul de 4 a 8 mm, para contribuir na absorção da umidade. Após secagem em capela, as cápsulas contendo os extratos etanólico e metanólico de *C. citratus* foram mantidas em dessecador. Posteriormente, os extratos foram removidos das cápsulas com o auxílio de espátula e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), para realização dos tratamentos.

3.3. CULTURA CELULAR

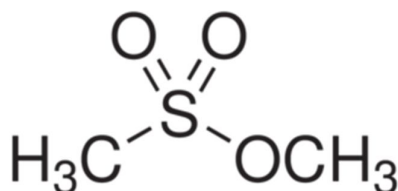
A cultura de linfócitos foi obtida a partir de sangue total de 3 voluntários adultos e saudáveis, de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 35 anos, sem histórico de doenças recentes, não-fumantes, sem exposição recente a radiações ou medicamentos, no período de 2013 a 2014. Foram coletados 7 mL de sangue periférico em seringa descartável heparinizada. Após a coleta, a seringa foi deixada em posição vertical, evitando o calor e agitação, a fim de prevenir hemólise.

Em um frasco de cultura contendo 4 mL de meio RPMI 1640 com HEPES (Cultilab, Brasil), 1 mL de soro fetal bovino (Inativado, estéril, isento de mycoplasma – Cultilab, Brasil), 100 µL de fitohemaglutinina A (Gibco, USA, Cat.# 10576-015), e 100 µL de penicilina-estreptomicina (Gibco, USA, Cat.# 15140-148), adicionou-se aproximadamente 0,5 mL de sangue periférico, o qual foi incubado a 37°C em estufa (502 FANEM – São Paulo – Brasil), por 48 horas. Após esse período, os tratamentos de clastogenicidade e anticlastogenicidade 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) (Figura 3), 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 foi de 1 µg/mL, estabelecida em testes pilotos.

Figura 3 - Estrutura Molecular de Metilmetanosulfonato.



Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

3.5. TRATAMENTOS

Os tratamentos sub-citados foram realizados simultaneamente por 24h.

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

3.6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (Gibco, USA, Cat.# 15250-061), um corante que penetra no interior das células que perderam a integridade da membrana plasmática. (MASCOTTI; MCCULLOUGH; BURGER, 2000). Dez microlitros da suspensão celular foram coletados e adicionamos a 90 μ L de meio RPMI 1640 com Hapes. 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 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Uma hora e trinta minutos antes de completar às 72 horas de incubação, aplicou-se 100 μ L de Colchicina 0,016% (CULTILAB, BRASIL) em cada frasco de cultura. Os frascos foram homogeneizados e devolvidos a estufa, 37°C, até completar as 72 horas. Os procedimentos para a colheita e a fixação foram baseados em Wu, Zheng e Hsu (2005), com modificações. Ao término da colheita e fixação, o material foi

armazenado à -4°C , até o momento da análise. A análise foi realizada em microscópio de luz, contando 100 metáfases por tratamento/voluntário, analisando o número e a integridade cromossômica.

3.8. ÍNDICE MITÓTICO

Para análise do índice mitótico (IM), o qual tem a função de analisar a proliferação adequada das células, (FACHINETTO et al., 2007), foram contadas 1000 células em microscópio de luz com aumento de 400x, diferenciando células em interfase de células em metáfase. O IM foi obtido através da equação $\text{IM} = m/T \times 100$.

Sendo que:

m = número de células em metáfase

T = número total de células (metáfases + interfases)

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

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 *Cymbopogon citratus*, indicando inexistência de citotoxicidade de ambos, em linfócitos humanos (Tabela 1).

Tabela 1- Avaliação de citotoxicidade dos extratos metanólicos e etanólicos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (100 µg/mL) em linfócitos humanos, pelo Método de Exclusão de Azul de Trypan.

Tratamentos	Citotoxicidade
	Média ±DP
Controle Negativo (DMSO)	99,98 ± 0,027 ^{ns}
Controle Positivo (MMS)	100,00 ± 0,000 ^{ns}
Clastogenicidade	
EE <i>C. citratus</i>	99,97 ± 0,026 ^{ns}
EM <i>C. citratus</i>	100,00 ± 0,004 ^{ns}
Anticlastogenicidade	
EE <i>C. citratus</i>	99,99 ± 0,006 ^{ns}
EM <i>C. citratus</i>	99,99 ± 0,05 ^{ns}

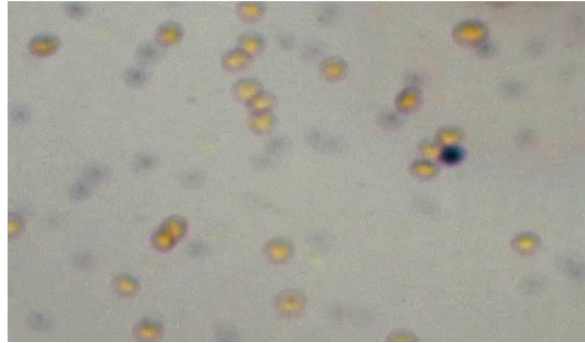
DMSO, dimetilsulfóxido (30 µL); MMS, metilmetanosulfonato (1 µg/mL); EE, extrato etanólico (100µg/mL); EM, extrato metanólico (100µg/mL); DP, desvio-padrão; ^{ns} Teste t-Student pareado, bicaudal, não significativo, (p>0,05).

Fonte: elaborado pelo autor

Na figura 3 é possível verificar as células viáveis (não coradas) e as inviáveis (coradas em azul), pelo método de coloração por Azul de Trypan.

Experimentos realizados utilizando extratos de *C.citratus*, como marcador de estresse oxidativo (atividade peroxidação), em macrófagos alveolares murinos estressados com lipopolissacarídeo, mostraram que, até mesmo quando administrada em dose alta, *C. citratus* reduziu marcadores de inflamação e foi capaz de restaurar a integridade da membrana mitocondrial, sugerindo, o seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e citoprotetor. (TIWARI ;DWIVEDI, 2010).

Figura 3 – Teste de Azul de Trypan em leucócitos humanos. Células incolores são viáveis e célula corada em azul é inviável. Aumento final: 400x



Fonte: Arquivo do laboratório.

Já Ravinder e colaboradores (2010), mostraram que extrato etanólico de *C.citratus* apresenta atividade antimutagênica em vários modelos, além de retardar os crescimentos de células de fibrossarcoma transplantado em ratos, sendo associado a prevenção de metástase pulmonar. O extrato da planta demonstrou a inibição sobre a formação de adutos de DNA induzidos por azoximetano e de focos criptas aberrantes, em cólon de ratos. Apresentou ainda, efeitos inibitórios sobre a fase precoce de hepatocarcinogênese, após a iniciação com dietilnitrosamina em ratos machos.

O índice mitótico variou de $7,5 \pm 3,43$ (média \pm desvio padrão) nos tratamentos com extrato etanólico de *C. citratus* a $21,15 \pm 12,33$ no controle positivo, indicando baixa reprodução celular, entretanto, esse baixo índice mitótico não deve ser atribuído à efeitos dos tratamentos, visto que não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2). Os resultados da análise de aberração cromossômica também foram observados na Tabela 2. O controle positivo apresentou (média \pm desvio padrão) $4,67 \pm 1,77$ metáfases alteradas e o controle negativo; $1,33 \pm 1,77$ metáfases alteradas, sendo que a análise estatística foi significativa ($p = 0,0317$), ou seja, mostrou que a ação do metilmetanosulfonato foi efetiva. Já a análise de genotoxicidade não apresentou resultados estatisticamente significativos, indicando a ausência de efeitos clastogênicos dos extratos metanólico e etanólico de *C. citratus* em linfócitos humanos. Para a análise de anticlastogenicidade foi obtido a mesma conclusão, tanto no extrato etanólico associado ao MMS ($6,00 \pm 2,00$), quanto no extrato metanólico associado ao MMS ($5,00 \pm 2,00$), não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$). Portanto, este resultado indica que os extratos etanólico e metanólico não são protetores ao DNA perante a indução de danos por MMS.

Vinitketkumnuen e colaboradores (1994) mostraram que a extrato etanólico de *C. citratus* não induziu mutações em *Salmonella typhimurium*, com ou sem alterações metabólicas. Mais, no entanto, no extrato foi encontrado propriedades antimutagênicas, onde houve uma indução química de mutação, onde as mutações de *AFB1*, *Trp-P-1*, *Trp-P2*, *Glu-P-1*, *Glu-P-2*, *IQ*, entre outras foram inibidas nos tratamentos com extrato de capim limão, de maneira dose-dependente, mas mesmo assim não foi encontrada nenhuma atividade de mutagênica.

Kauderer e colaboradores (1991) testaram o beta-mirceno (componente do óleo essencial de *C. citratus*), em células de mamíferos *in vitro*, onde mostrou que na presença e na ausência de S9-mix não houve a indução de aberração cromossômica, nem indicação de citotoxicidade

Portanto, os dados dos estudos citados acima são semelhantes com os obtidos no presente trabalho, visto que não induzem aberrações cromossômicas em células normais, como nosso modelo experimental.

Guimarães e seus colaboradores (2011) avaliaram a atividade antioxidante e os efeitos fungitóxicos do óleo essencial de capim limão e do seu citral, sobre a inibição dos fitopatógenos onde foi realizada a atividade antioxidante empregando um método de redução de radical livre, DPPH, e o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. O óleo essencial e o citral mostraram uma pequena atividade antioxidante para radicais estáveis de DPPH, mas em contato com o β -caroteno/ácido linoleico apresentaram uma atividade significativa. Pode ser constatado também que o citral causou maiores inibições miceliais, para todos os fitopatógenos.

Estudo semelhante foi realizado por Moraes e colaboradores (2009), que através do radical livre DPPH em solução metanólica, analisaram a ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Onde foram analisadas varias espécies de plantas medicinais, inclusive *C. citratus*, onde mostrou uma não eficiência na utilização do radical livre DPPH.

Portanto, os estudos acima podem ser justificados, pela *C. citratus* não apresentar uma facilidade em doar hidrogênio pela parte dos seus compostos, para neutralizar o radical DPPH. Estes estudos se encaixam no projeto proposto devido anticlatogenicidade, que pode estar relacionada com os compostos antioxidantes presentes no extrato da *C. citratus*.

Tabela 2 - Avaliação de aberração cromossômica em leucócitos humanos na avaliação de clastogenicidade e anticlastogenicidade de extratos metanólicos e etanólicos de *Cymbopogon citratus* (D.C)

Tratamentos	Índice Mitótico	Células com Aberração	Tipos de Aberrações Cromossômicas
	(%)	cromossômica	
	Média ± DP	Média ± DP	
Controle Negativo (DMSO)	17,82 ± 9,68	1,33±1,77 ^a	2 QCT, Re, QCM
Controle Positivo (MMS)	21,15 ±12,33	4,67±1,77 ^b	3 QCT, 4Re, 4QCM, 1Quebra na região do centrômero, 3 Gap, 1 Dic
Clastogenicidade			
EE <i>C. citratus</i>	15,7 ± 16,14	6,00±1,33 ^a	11 Re, 4 Gap, 4 QCT,
EM <i>C. citratus</i>	7,5 ± 3,43	7,00±1,33 ^a	1 Quebra centrômero, 12 Re, 2 QCT, 2 Gap, 1 Anel
Anticlastogenicidade			
EE <i>C. citratus</i> + MMS	9,46 ± 4,84	6,00±2,00 ^b	11 Re, 1 Gap, 2 QCT, 1 Anel, 2 QCM
EM <i>C. citratus</i> + MMS	14,53 ± 10,7	5,00±2,00 ^b	10 Re, 3 Gap, 3 QCM, 1 Anel

DMSO, dimetilsufóxido (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, unicaudal, tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa (p>0,05); tratamentos seguidos de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p<0,05). QCM, quebra cromossômica; QCT, quebra cromatídica; Anel, cromossomo em anel; Re, rearranjo cromossômico; Gap, Gap cromossômico; Dic, Cromossomo dicentrico.

Fonte: elaborado pelo autor

5. CONCLUSÃO

Os estudos descritos nesse trabalho mostraram que os extratos metanólicos e etanólicos de *C. citratus*, em presença de indutores de danos como a metilmetanosulfonato, não protegem o DNA, entretanto, também não induzem danos aos cromossomos. Portanto estes extratos não apresentam atividades clastogênicas, tampouco, anticlastogênicas. Entretanto, dados da literatura indicam que não há indução de aberrações cromossômicas por extratos de *C. citratus*, quando testados, podendo ser um indicativo de novas realizações de estudos que esclareçam os potenciais citoprotetores e antimutagênicos de *C. citratus*, para que sejam utilizados sem que se tornem riscos potenciais a saúde humana.

Estudos sugerem ainda, que componentes antioxidantes presentes em algumas plantas podem ser indicativos de efeitos anticlastogênicos.

REFERÊNCIAS

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

BLANCO, M.M.et.al. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**. v. 16, n. 2-3 , p. 265-270, 2009. Disponível em: <http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2121>. Acesso em: 24 Set. 2015.

CANISELLA, N.T. **Efeitos de substâncias químicas: agentes mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos**. 2014 Disponível em: <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/efeitos-de-subst%c3%a2ncias-qu%c3%admicas-agentes-mutag%c3%aanicos/61662127.html>>. Acesso em: 17 out. 2015.

CAPIM SANTO. **Capim santo ou erva cidreira**. Disponível em: <<http://trekosekakarekos.blogspot.com.br/2009/06/capim-santo-ou-erva-cidreira-medicinal.html>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

CASTILLO, J.. **Mutações cromossômicas estruturais**. 2012 Disponível em: <<http://biologianet12.blogspot.com.br/2012/02/mutacoes-cromossomicas-estruturais.html>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

COSTA, C. A.R.A. et. al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p. 828-836. 2011. Acesso em: 24 Set. 2015.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Revista de Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 956-959, 2005.

CRAVEIRO AA. et. al. Óleo essencial de lemongrass. In: *Óleos essenciais de plantas do Nordeste*. **EUFC**, Fortaleza p.153. 1981.

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

DI STASI, L. C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: **Editora Universidade Estadual Paulista**, 2002. 604p.

FACHINETTO. J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de achyrocline satureioides dc (asteraceae) sobre o ciclo celular de allium cepa. **Revista brasileira de farmacognosia**, p. 49-54, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a11v17n1>>. Acesso em: 04 Dez. 2015.

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

FONSECA, K. Aberrações cromossômicas - **Brasil escola**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/biologia/aberracoes-cromossomicas.htm>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

FORMIGONI M.L.O.S., et. at. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed "in utero". **J Ethnopharmacol** 17: 65-74. 1986.

FRANCO, L.C.L.; LEITE, R. C. Fitoterapia para a Mulher. **Corpomente**, Curitiba, 375p. 2004. Disponível em: <http://medicinadasplantas.blogspot.com.br/2009_04_01_archive.html> Acesso em: 03 Jul 2015.

GOMES, E. C. Aspectos do cultivo e beneficiamento do capim-limão (*cymbopogon citratus* (d.c.) stapf) no estado do paraná, brasil. **revista visão acad mica**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 11-8, 2001. Disponível em: <<http://www.visaoacademica.ufpr.br/n2/capimlimao.htm>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

GOMES. *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf: botanical and ecological aspects. **Visão acad mica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, jul. 2003. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/academica/article/viewfile/534/447>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista ciência agron mica**, Fortaleza, brasil, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

GUIMARÃES, L. G. D. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxida o do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008 Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n6/a37v31n6.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

KAUDERER, B. et al. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. . **Environ mol mutagen**, v. 18, n. 1, p. 28-34, 1991. undefined. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864266>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 34, n. 3, p. 479-488, jul-set., 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3168191/pdf/gmb-34-3-479.pdf>>. Acesso em: 09 Jul. 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002.

MACIEL, M. A. M. et al. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v25n3/9337.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

MASCOTTI, K.; MCCULLOUGH, J.; BURGER, S. R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. **Transfusion**, v. 40, n. 6, p. 693-696, jun. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x/abstract;jsessionid=D00E7958C3CA91B6BCA7E17368502339.f04t01>>. Acesso em: 19 Jul. 2015.

MARINHO, et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007. Disponível em: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_07_3/artigo9_v9_n3.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2015.

MELDAU D. C. Agentes mutâgenicos - biologia - **infoescola**. 2006. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/biologia/agentes-mutagenicos/>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista brasileira de farmacognosia recebido**, Fortaleza, Brasil, Jan. 2009.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética**, p. 107-112, 1991.

RAVINDER K, et. al. Pharmacognostical Investigation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, **Der Pharmacia Lettre**, v. 2(2) p. 181-189. 2010.

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%3Folang%3Dpt>>. Acesso em: 05 Jul. 2015.

TIWARI, M; DWIVEDI, U. N. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* (D. Stapf) extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510004850>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

TORTORIELLO, J., ROMERO, O. Plants used by mexican traditional medicine with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. **Arch. Med. Res.** 23, 111-116.1992

VEIGA, V.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M A M.. Medicinal plants: safe cure?. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, mai./jun. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

VINITKETKUMNUEN, U. et al. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *salmonella* mutation assay. **Mutation Research**, v. 341. P. 71-75. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165121894900256.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. 500p. Acesso 15 Jul. 2015.

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