

TESTES CITOGENÉTICOS NA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS PROVINDOS DE PLANTAS MEDICINAIS

CYTOGENETIC TESTS IN EVALUATION OF NATURAL PRODUCTS GENOTOXICITY
STEMMED OF MEDICAL PLANTS

ANDRÉ MORADORE VERRI¹, ANGÉLICA DE ALMEIDA MOURA², VAGNER MARQUES DE MOURA^{3*}

1. Acadêmico do Curso de Graduação em Farmácia da UNINGÁ - Centro Universitário Ingá; 2. Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da UNINGÁ - Centro Universitário Ingá; 3. Químico, Mestre, Doutorando em Química de Produtos Naturais pela Universidade Estadual de Maringá e Docente do Curso de Farmácia e Biomedicina da UNINGÁ - Centro Universitário Ingá.

*Rodovia PR 317, N° 6114, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87035-510 ymmoura@yahoo.com.br

Recebido em 18/10/2016. Aceito para publicação em 15/01/2017

RESUMO

A utilização de plantas para fins medicinais tem sido uma alternativa da população para o cuidado das necessidades primárias de assistência à saúde, porém, para a grande maioria das espécies não existe nenhuma comprovação técnico-científica sobre o potencial terapêutico, toxicológico e principalmente sobre a genotoxicidade no organismo humano. Portanto, a falta de informações e uso indiscriminado principalmente na forma de infusões e chás podem provocar mais efeitos nocivos do que benéficos, pois as substâncias químicas podem ser tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho de revisão bibliográfica foi descrever os principais testes citogenéticos empregados no monitoramento da mutagenicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) de fitoterápicos, extratos vegetais e seus derivados, com intuito de garantir a qualidade e medidas de segurança para a saúde humana, bem como informar a comunidade científica e a população sobre os riscos e efeitos colaterais do consumo inadequado de plantas medicinais.

PALAVRAS-CHAVE: Testes citogenéticos, genotoxicidade, plantas medicinais.

ABSTRACT

The use of plants for medicinal purposes has been a people's alternative to the care of the basic needs of health care, but for the vast majority of species there is no technical and scientific evidence on the therapeutic potential toxicological and especially on genotoxicity in the human body. Therefore, the lack of information and widespread use mainly in the form of teas and infusions can cause harmful effects of more beneficial that, for the chemicals may be toxic, mutagenic and carcinogenic. In this context, the objective of this work of literature review was to describe the main tests cytogenetic employees in monitoring the

mutagenicity (cytotoxicity and genotoxicity) of herbal, plant extracts and derivatives, in order to ensure the quality and safety measures for human health, and to inform the scientific community and the public about the risks and side effects of inappropriate use of medicinal plants.

KEYWORDS: Cytogenetic tests, genotoxicity, medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

As plantas consideradas medicinais são utilizadas desde a antiguidade pelas populações de todo o mundo no tratamento e cura de enfermidades. Esta prática tem ressurgido com maior força através da fitoterapia que proporciona outra opção medicamentosa atualmente aceita e bastante acessível em vários países. No Brasil, tem sido empregada principalmente para o cuidado das necessidades primárias de assistência à saúde devido as dificuldades de atenção médica e farmacêutica, falta de recursos financeiros para a compra de fármacos industrializados, além da tendência da utilização de produtos naturais por muitas comunidades¹.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60-80% da população mundial dependem da medicina popular nos seus cuidados básicos de saúde, e deste total, 85% utilizam-se de plantas e seus derivados como forma terapêutica^{2,3}.

Devido a grande demanda e difusão da utilização de plantas medicinais, a indústria farmacêutica tem desenvolvido vários fitofármacos à base de extratos vegetais padronizados, os quais são registrados para atender diferentes especialidades médicas⁴.

Entretanto, para a grande maioria das plantas reputadas como medicinais, não existe nenhuma comprovação técnico-científica e garantia de sua eficácia, segurança e

qualidade³. Sabe-se que para um fármaco ter eficácia são necessários estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos e avaliações dos efeitos biológicos preconizados, enquanto que para a segurança utilizam-se testes que revelam a ausência de efeitos tóxicos⁵.

Neste contexto, a falta de informações e o uso indiscriminado de plantas medicinais pela população, principalmente na forma de infusões e chás podem provocar mais efeitos nocivos do que benéficos, pois as substâncias químicas presentes nas espécies vegetais podem ser tóxicas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas quando ingeridas sem restrições e indiscriminadamente. Portanto, são necessários estudos que avaliem o potencial mutagênico (citotóxico e genotóxico), bem como os eventuais danos causados ao organismo humano, principalmente os relacionados com o aumento da taxa de mutações do material genético em níveis basais^{6,7,8}.

A genotoxicidade é conhecida como uma ação nociva que afeta a integridade celular de material genético de forma que os agentes genotóxicos interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA) gerando modificações na sua estrutura e função. Assim, se estas modificações se fixarem ao ponto de serem transferidas diz-se que ocorreram mutações⁹.

As mutações são consideradas a fonte da variabilidade genética de um grupo, essenciais para manutenção das espécies e, portanto, podem provocar enfermidades em todas as gerações de um indivíduo. As mutações gênicas estão envolvidas nos processos de carcinogênese e teratogênese e a identificação de substâncias potenciais que levam a estas alterações pode ser facilmente analisada através de testes que detectam os componentes genotóxicos numa matriz. Foi reportado que os compostos genotóxicos possuem características e propriedades físicas e químicas capazes de interagir com os ácidos nucleicos, os quais podem levar a defeitos relacionados a hereditariedade mediante a mutações observadas em células germinativas. Este efeito ocorre, pois, os compostos genotóxicos são altamente reativos no meio. No caso dos defeitos hereditários por mutações em células somáticas é notória a formação de tumores (benignos e malignos) e recentemente foi evidenciado que este tipo de mutação também está relacionado na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas e neurodegenerativas^{10, 11}.

No Brasil, a utilização de produtos de origem natural como fonte de recurso terapêutico é elevada (cerca de 80%), e a validação e segurança nem sempre são avaliadas¹². Desta forma, deve-se ter um monitoramento mais preciso e eficaz para o consumo, garantindo assim a qualidade, segurança e o potencial medicinal.

Portanto, este trabalho tem por objetivo descrever os principais testes citogenéticos empregados no monitoramento da mutagenicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) de fitoterápicos, extratos vegetais e seus deriva-

dos, com intuito de garantir a qualidade e medidas de segurança para a saúde humana, bem como informar a comunidade científica e a população sobre os riscos e efeitos colaterais do consumo inadequado de plantas medicinais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo a temática norteadora da revisão bibliográfica foi a descrição dos principais testes citogenéticos empregados na avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de fitoterápicos, extratos vegetais e seus derivados comumente utilizados pela população.

No levantamento dos dados científicos foram consultadas as bases de dados LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), a biblioteca SciELO (*Scientific Electronic Library on line*), PubMed (*National Center for Biotechnology Information – NCBI, U.S. National Library of Medicine*), Science Direct (*Science, Health and Medical Journals Explore Scientific, Technical, and Medical Research*) e SciFinder (Chemical Abstract Service).

3. DESENVOLVIMENTO

Bioensaios empregados na avaliação de mutagenicidade de produtos naturais

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos produzidos por substâncias presentes nos produtos naturais, principalmente extratos vegetais e seus derivados podem ser avaliados mediante diversos bioensaios devido a considerável sensibilidade e confiabilidade dos resultados. Dentre os bioensaios destacam-se o Sistema teste vegetal de *Allium cepa*, o Teste de Ames, o Teste de micronúcleos e o Teste do cometa¹³.

Os bioensaios citogenéticos têm por finalidade investigar os principais agentes capazes de afetar em nível fisiológico e molecular de uma matriz exposta. Assim, se o agente gerar danos ao DNA acredita-se que há um potencial citotóxico e genotóxico para os diferentes tipos de células, tais como animal, vegetal e microbiana¹³.

Uma alternativa que vem sendo utilizada na detecção destes agentes é o emprego de biomarcadores, que são organismos fenotipicamente mais sensíveis a lesões no DNA, sendo considerados indicadores que expressam de forma mais precisa as possíveis alterações externas as quais estes organismos são expostos^{14,15}.

Atualmente, os testes citogenéticos são validados pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS), Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para o monitoramento *in situ*, *in vivo* e *in vitro* da citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias, principalmente as provindas de fonte vegetal^{1,16}.

Sistema teste de *Allium cepa*

O sistema teste utilizando as raízes de *Allium cepa* tem sido muito utilizado no monitoramento da genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade de produtos naturais, devido sua alta sensibilidade e correlações com outros testes citogenéticos³.

O bioensaio avalia anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas da ponta da raiz de *A. cepa*. Uma condição necessária na detecção das possíveis alterações e danos dos agentes mutagênicos é que a amostra testada deva estar em constante divisão mitótica para que se avalie as etapas da divisão celular ao longo do ciclo celular mediante os parâmetros de índice mitótico e índice de replicação^{17,15}.

Neste teste os bulbos de *A. cepa* ficam em contato direto com uma solução aquosa da planta medicinal (infusão) em diferentes concentrações por um determinado período. A análise da ação citotóxica é avaliada pela redução do crescimento das raízes ou da diminuição do índice mitótico, e a ação genotóxica é monitorada pela análise de micronúcleos ou pelas anormalidades das etapas anáfase-telófase^{18,19}.

A literatura relata diversos estudos que corroboram o emprego do sistema teste de *A. cepa* como uma importante ferramenta e biomarcador no monitoramento de genotoxicidade de extratos e infusões de plantas medicinais e os resultados tem indicado como principais efeitos o aumento e diminuição da proliferação celular, estabelecendo que muitas plantas podem apresentar potencial mutagênico e antimutagênico²⁰.

Dentre as várias espécies medicinais avaliadas por este teste pode-se citar: *Averrhoa carambola* (caramboleira), *Cissus sicyoides* (uva-brava), *Syzygium cumini* (jamelão), *Achillea millefolium* (mil-flohas), *Bauhinia candicans* (pata-de-vaca), *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Psidium guajava* (goiabeira), *Plantago lanceolata* (língua-de-ovelha), *Abelmoschus esculentus* (quiabeiro), *Symphytum officinale* (confrei).

As principais vantagens deste bioensaio são a rapidez da técnica, baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou alterações na divisão celular, incluindo a avaliação de riscos de aneuploidia, bem como a sensibilidade, confiabilidade e correlações com outros testes de genotoxicidade. Desta forma, os resultados positivos utilizando produtos naturais no teste de *A. cepa* auxiliam no estabelecimento de medidas de controle e segurança no uso indiscriminado de plantas pela população^{18,21}.

O teste de Ames

O teste de Ames foi descrito pelo pesquisador Bruce Ames e colaboradores na década de 70 e tem sido muito empregado para identificar mutágenos entre subs-

tâncias químicas puras e misturas complexas^{22,23}.

No teste utilizam-se como indicadores linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, as quais possuem características susceptíveis a uma maior sensibilidade às substâncias que induzem a diferentes mutações. Assim, no processo podem-se incluir as sequências sítio-específicas no DNA que responde de forma eficaz na reversão, plasmídeos contendo genes que induzem ao aumento do processo de reparo sujeito ao erro, bem como o aumento da permeabilidade celular de macromoléculas e ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro^{24,25}.

Neste bioensaio deve-se considerar a utilização de células procarióticas, principalmente pelas diferenças no metabolismo, permeabilidade, processo de reparo do DNA e estrutura dos cromossomos destas células quando comparados às células de mamíferos. Os experimentos são conduzidos *in vitro* e devem ser acrescidos de uma fonte exógena de metabolização para que ocorra a mitemização parcial²⁶.

Na presença de agentes mutagênicos as cepas de *S. typhimurium* alteram o caráter auxotrófico para a síntese de histidina resultando em diferentes mutações no operon do aminoácido, além de auxiliarem na detecção de mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases²⁴.

Outro fator relevante é que sem a presença de histidina as linhagens não crescem no meio de cultura mínimo, e para o resultado é necessário a contagem de colônias que crescem por placa (número de revertentes) através da exposição das suspensões de *S. typhimurium* frente à amostra^{22,27}.

Estudos conduzidos com várias plantas quanto ao potencial mutagênico indicaram tanto resultados negativos quanto positivos. As espécies medicinais de bambus da família Gramineae *Bambusa tuldoides*, *Sinocalamus beecheyana* e *Phyllostachys nigra*, bem como a planta *Rhizoma Polygonati Odorati* utilizada popularmente pelos chineses contra tuberculose e diabete, foram investigadas quanto a segurança dos extratos aquoso e hidroalcoólico pelo teste de Ames na presença e ausência de ativação metabólica empregando as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*. Os resultados demonstraram que os extratos não apresentam atividade mutagênica^{28,29}.

Semelhantemente, a inexistência de ação mutagênica frente às linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram evidenciadas para os frutos da espécie *Gardenia jasminoides* comumente utilizados como fitofármacos na medicina tradicional da China³⁰. Os extratos das plantas medicinais *Camelia sinensis* (chá-da-Índia), *Momordica charantia* (melão-de-São-Caetano), *Stevia pilosa* e *S. eupatoria* também exibiram efeito antimutagênico pelo teste de Ames³¹.

No entanto, diversos estudos comprovaram que mui-

tos extratos brutos, frações e substâncias químicas isoladas de plantas consideradas medicinais apresentam mutagenicidade. Os principais exemplos são os extratos das espécies *Ocotea duckei* (louro-de-cheiro), *Ocimum basilicum* (manjerição ou alfavaca), *Crinum macowanii* (açucena), *Diospyros whyteana* (café-selvagem), *Catharanthus roseus* (vinca ou maria-sem-vergonha), *Ziziphus mucronatae* e *Combretum mkhzenze*^{32,33,34}.

A presença de flavonoides, taninos e antraquinonas nos extratos de *Myrciaria tenella* (jabuticaba-macia ou cambuí-açu), *Smilax campestris* (salsa-parrilha), *Tripodanthus acutifolius* (erva-de-passarinho) e *Senna corymbosa* (sena-do-campo) podem ser os responsáveis pela ação mutagênica destas espécies, bem como o observado em frações ricas com derivados antraquinônicos em *Aloe vera* (babosa)^{35,36}.

Os alcaloides e flavonoides presentes no extrato das folhas e frações enriquecidas obtidas de *Strychnos pseudoquina* (quina) planta reputada como medicinal no tratamento de doenças hepáticas, úlceras estomacais, febre e malária, também exibiram atividade mutagênica³⁷.

Neste sentido, o teste de Ames apresenta-se como um importante método na identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos e antimutagênicos, com considerável sensibilidade, eficiência e confiabilidade para os produtos naturais, principalmente os extratos, frações e substâncias puras isoladas de plantas medicinais.

O teste de micronúcleo

Os micronúcleos foram relatados pela primeira vez pelo cientista Howell em 1891 como sendo inclusões citoplasmáticas presentes em células vermelhas encontradas no sangue de gatos com anemia e em 1901 o pesquisador Jolly corroborou observando essas estruturas em eritrócitos de embriões de ratos³⁸.

Sabe-se que vários mecanismos, como quebra cromossomal (clastogênese) e rompimento das fibras do fuso mitótico (aneuploidogênese) estão diretamente relacionadas e envolvidas na formação dos micronúcleos através do surgimento de um "pequeno núcleo", envolto por membrana (micronúcleo) totalmente separado do núcleo principal e com colorações idênticas devido ao seu conteúdo de DNA¹³.

A indução de um micronúcleo tem sido utilizada na avaliação de danos genotóxicos quando submetidos a substâncias mutagênicas, caracterizado como outro método de detecção de aberrações cromossômicas em eucariotos do tipo clastogênese³⁹.

A análise de células micronucleadas do sangue de camundongos através da observação das colorações das lâminas pré-coradas com *acridine Orange* tem sido uma técnica descrita por Hayashi e colaboradores (1990), em

que as células basais de DNA apresentam coloração amarela e as de RNA vermelha. Esta técnica permite caracterizar em nível de citoplasma as células de eritrócitos jovens ricos em RNA ribossomal (policromatófitos) e reticulócitos (vermelhas), além dos micronúcleos colorados em amarelo¹³.

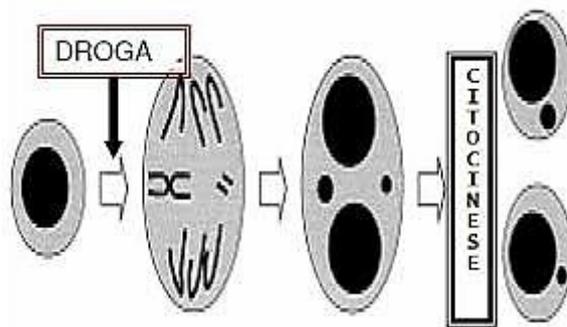


Figura 1. Formação de micronúcleos em células eucarióticas¹⁵.

O fornecimento de várias amostras de sangue periférico por um mesmo camundongo sem a necessidade de eutanásia, bem como a abundância, fácil preparação, uniformidade da população e confiabilidade, representam as principais vantagens de se empregar esta técnica. Além disso, a técnica permite avaliar micronúcleos no diagnóstico de doenças hematológicas e no monitoramento do potencial mutagênico e antimutagênico de diferentes amostras mediante a análise em roedores, peixes e principalmente em plantas medicinais¹³.

Estudos realizados com a espécie *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto) empregando o teste de micronúcleo em medula óssea e sangue periférico de camundongos indicou uma significativa diminuição dos danos causados ao DNA utilizando ciclofosfamida no tratamento⁴². Os extratos de *Miconia rubiginosa* e *M. stenostachya* plantas utilizadas na medicina popular produziram uma redução da frequência de células micronucleadas indicando efeito protetor ao DNA⁴⁰.

Infusões das folhas de *Plantago major* (tansagem ou transagem), planta utilizada por suas propriedades antibiótica, anti-inflamatória e antitumoral, revelou índices de efeitos clastogênico e aneugênico compatíveis para ausência de atividade genotóxica quando avaliada pelo método do micronúcleo⁴¹.

O teste cometa

O teste cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é um método de genotoxicidade para avaliar danos e efeitos de reparos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. As células com dano aumentado no DNA apresentam um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em sentido do ânodo com aspecto semelhante a forma de um come-

ta^{42,13}.

O princípio do método consiste na disposição de uma suspensão de células inclusas em gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia, as quais são transferidas para uma solução eletrolítica contendo detergente para lisar as células, com o intuito de remoção do conteúdo citoplasmático e membrana celular. Posteriormente, as lâminas são imersas em solução tampão para que ocorra o desenovelamento das cadeias de DNA, através da ruptura das estruturas secundárias e terciárias do núcleo (clastogênese) e em seguida aplica-se uma corrente elétrica para induzir a migração dos fragmentos de DNA no mesmo sentido da corrente elétrica^{43,44}.

A determinação do grau da lesão no DNA é obtida por microscopia óptica em que se analisa criteriosamente um total de cem células e as classificam em diferentes graus de lesão que podem variar de zero, indicando células sem alteração morfológica, até quatro que indica DNA fragmentado por completo^{43,13}.

O teste cometa pode ser considerado um método simples, rápido, sensível, de baixo custo e pode ser realizado para qualquer eucarioto sendo necessárias amostras celulares extremamente pequenas. Os principais danos observados no DNA estão relacionados às quebras simples ou duplas e as resultantes de reparos por excisão, além de danos alcali-lábeis e crosslinks. No entanto, este método pode ser utilizado apenas como um indicativo de mutagenicidade, não sendo aplicado para detectar mutações, pois as lesões genômicas podem sofrer reparação pelo sistema de reparo intracelular⁴⁵.

As folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) são muito utilizadas popularmente na forma de bebidas e apresentam propriedade antioxidante, antiobesigênica, analgésica e antibacteriana. Estudo *in vitro* com as infusões da planta mostrou efeito genotóxico dose-dependente e a análise *in vivo* indicou que o extrato aquoso promoveu danos no DNA das células de diferentes órgãos de camundongos pelo teste cometa⁴⁶.

A análise *in vivo* da capacidade genotóxica e anti-genotóxica do extrato e infusão da planta medicinal *Melissa officinalis* (erva-cidreira) não demonstraram ação genotóxica, porém o extrato na concentração de 500 mg/Kg apresentou efeito protetor parcial referente aos danos⁴⁷.

A atividade genotóxica dos extratos de *Plectranthus ornatos* (boldo) e *Annona muricata* (graviola) foram avaliadas pelo teste cometa em linfócitos humanos e os resultados indicaram que o boldo não induziu alterações no DNA, porém a graviola promoveu danos na dependência da concentração⁴⁸.

5. CONCLUSÃO

A identificação de substâncias químicas em fitoterápicos, extratos de plantas e seus derivados com potencial

ação genotóxica e citotóxica, bem como seus possíveis efeitos colaterais no organismo humano é uma ferramenta importante para a validação e segurança dos produtos naturais comumente consumidos pela população.

Neste contexto, vários modelos de bioensaios citogenéticos foram desenvolvidos com técnicas de análise e atualmente eles detectam tais potenciais mutagênicos. Pesquisas que envolvam esta temática devem ser priorizadas e incentivadas em todo o mundo, pois contribuirá para um maior conhecimento e orientação da população a respeito do uso seguro e racional de plantas medicinais no tratamento das doenças.

REFERÊNCIAS

- [1] Gabrera GL, Rodriguez DMG. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat Res.* 1999; 426(2):211-214.
- [2] Kaur N, Delcros, JG, Martin B, Phanstiel O. Synthesis and biological evaluation of dihydromotuporamine derivatives in cells containing active polyamine transporters. *J Med Chem.* 2005; 48(11):3832-9.
- [3] Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 17(3): 444-7.
- [4] Melo JG, Martins JDSP, Amorin ELC, Albuquerque UP. Qualidade de Produtos a base de Plantas Medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-india (*Aesculus hippocastanum*); capim-limão (*Cymbopogon citratus*); e centelha (*Centella asiatica*). *Acta Bot. Bras.* 2007; 21(1):27-36.
- [5] Farias MR. Avaliação de qualidade de Matérias-primas vegetais. p.197-200. In: SIMOES CMO. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. UFSC. 2001.
- [6] Capasso R, Izzo AA; Pinto L, Bifulco T, Vittobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia.* 2000; 71(1):S58-S65.
- [7] Nunes APM, Araujo AC. Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro. 2003; Anais. p.15.
- [8] Guidotti DGM, Guidotti DT, Berti AP, Düsman E, Vicentini VEP. Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa L.* em células hematopoiéticas de ratos Wistar. *Ver Bras Bioci.* 2014; 12(1):42-5
- [9] Umbuzeiro GA, Roubicek DA. Genotoxicidade ambiental. In: Zagatto PA; Bertolotti E. Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima. 2003; p.327-344.
- [10] Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res.* 2003; 523.
- [11] Ross CA, Margolis RL. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. *Clin Neurosc Res.* 2005; 5(1):3-14.
- [12] Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. Ed. UNESP, São Paulo, 230 pp. 1996.

- [13] Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética toxicológica. Porto Alegre, Alcance, 422p. 2003.
- [14] Costa RMA, Menk CFM. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2000.
- [15] Silva FC, Barros MAB, Viana RR, Romão NF, Oliveira MS, Meneguetti DUO. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongo. Rev Cient Facul Educ e Meio Amb. 2011; 2(1):13-22.
- [16] Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17:49-54.
- [17] Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. J Ethnopharmacol. 2002; 81(1):11-6.
- [18] Fiskejo G. *Allium test* II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L. Environ Toxicol and Waters Quality. Internat J. 2003.
- [19] Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. Acta Scientiarum. 2001; 23(2):593-8.
- [20] Knoll MF, Silva ACF, Cantodorow TS, Tedesco SB. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on (*Allium cepa*) root-tip cells. Genet Mol Biol. 2006; 29(3):539-542.
- [21] Varanda EA. Atividade mutagênica de plantas medicinais. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2006; 27(1):1-7.
- [22] Henriques JAP, Valsa JO, Gomes RA. Utilização de Testes de Microrganismos par detecção de atividade mutagênica e/ou potencialmente mutagênica. In Ointo, S. O. C. Genética molecular de microrganismos. São Paulo, Manole, p. 330-350, 1987.
- [23] Rolla HC. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e do lodo proveniente da indústria de papel e celulose. Porto Alegre, 1995. 114f. Dissertação de Mestrado. UFRGS.
- [24] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983; 113(3-4):173-215.
- [25] Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introdução à genética. São Paulo. Guanabara-Koogan, 7ed, 794p. 2002.
- [26] Rabello-Gay MN. Genética Toxicológica: Bases e Metas. Instituto Butantan, São Paulo, 1991.
- [27] Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests. Mutat Res. 2001; 492:9-38.
- [28] Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L, Zhou Y, Jiang J. Toxicity studies of Rhizoma Polygonati Odorati. J Ethnopharmacol. 2001; 74(3):221-4.
- [29] Zhang Y, Wua X, Ren Y, Fu J. Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings. Food Chem Toxicol. 2002; 42(11):1867-75.
- [30] Ozaki A, Kitano M, Furusawa N, Yamaguchi H, Kuroda K, Endo G. Genotoxicity of gardenia yellow and its components. Food Chem Toxicol. 2002; 40(11):1603-10.
- [31] Rabello-Gay MN, Rodrigues MAR, Monteleone-Neto R. Mutagênese teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Rev Bras Gen. 2001; 8(1):21-6.
- [32] Lopez AGL, Parra AV, Ruiz AR, Piloto J. Estudo toxicogenético de um extrato fluido de *Ocimum basilicum* L.(albahaca blanca). Rev Cubana Plant Med. 2000; 5(3):78-83.
- [33] Elgorashi EE, Taylor JLS, Maes A, Van Staden J, De Kimpe N, Verschaeve L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. Toxicol Lett. 2003; 143(2):195-207.
- [34] Marques RCP, Medeiros SRB, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Agnez-Lima LF. Evaluation of the mutagenic potential of yangabin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by Ames Test. Mutat Res. 2003; 3(1):41-6.
- [35] Ferreira ICDF, Vargas VMF. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/ microsome assay. Phytother Res. 1999; 13(5):397-400.
- [36] Parra AV, López AG, Ruiz AR, Ferrer JP, Martinez RR. Derivados antraquinônicos del *Aloe vera* L. tamizaje genotóxico. Rev Cubana Plant Med. 2000; 5(2):46-50.
- [37] Santos FV, Colus IMS, Silva MA, Vilegas W, Varanda EA. Assessment of the mutagenic potential of extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. Food Chem Toxicol. 2006; 44(9):1585-9.
- [38] Slesinski RS, Guzzie PJ. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: Ballantyne B. Perspectives in basic and applied toxicology. London: John Wright; 1988.
- [39] Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna MD, Tucker JD, Vanprais PH, MacGregor JT. Micronuclei as a index of Citogenetic Damage: past, present and future. Environ Mol Mutagen. 1983 18(4):277-91.
- [40] Serpeloni JM, Vilegas W, Varanda EA, Colus IMS. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo Semina: Ciênc Biol Saúde. 2008; 29(1):47-56.
- [41] Luz AC, Pretti IR, Dutra JCV, Batitucci MCP. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. Rev Bras Pl Med. 2012; 14(4):635-42.
- [42] Speit G; Hartmann A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Met Mol Biol. 2006; 314:275-86.
- [43] Hartmann A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis. 2003; 18(1):45-51.
- [44] Ribeiro LR, Marques EKA. Importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro LR; Salvadori DMF; Marques EK; Mutagênese Ambiental. Editora ULBRA. 2003.
- [45] Scherer K, Strohschoen AAG. Padronização do Teste Cometa para análise de genotoxicidade como Atividade de ensino para graduação na área da saúde. Rev Destaque Academ. 2013; 5(3):5-10.
- [46] Sampaio J. et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos

aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. Rev Bras Bioci. 2012; 10(4):462-7.

- [47] Carvalho NC. Avaliação Do Potencial Genotóxico e Antigenotóxico de *Melissa Officinalis*. 2009. TCC curso de Farmácia. UNESC.
- [48] Rocha RS. Avaliação da genotoxicidade de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos. 2016. Tese de Doutorado. UFFS.