



ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *ABELMOSCHUS ESCULENTUS* (QUIABO) PELO TESTE *ALLIUM CEPA*

STUDY THE GENOTOXICITY OF EXTRACT *ABELMOSCHUS ESCULENTUS* (OKRA) BY TEST *ALLIUM CEPA*

Josiene Felix de Moura Macedo *

Bacharel em Fisioterapia / Faculdade Santo Agostinho
Email: fisiojosienefelix@gmail.com.br
Teresina, Piauí, Brasil

Mariana Sousa Silva

Bacharel em Fisioterapia / Faculdade Santo Agostinho
Email: mariana_sousasilva@hotmail.com
Teresina, Piauí, Brasil

Nelson Jorge Carvalho Batista

Mestre em Genética e Toxicologia Aplicada/Universidade Luterana do Brasil
Email: nelsonjcb@hotmail.com
Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil

Valdiléia Teixeira Uchoa

Doutora em Ciências e Biotecnologia/Universidade Federal de Alagoas
Professora Adjunta do Departamento de Química/Universidade Estadual do Piauí
Email: vtuquimica@yahoo.com.br
Teresina, Piauí, Brasil

Wellington dos Santos Alves

Mestre em Bioengenharia/ Universidade do Vale do Paraíba
Professor da Universidade Estadual do Piauí
Email: wellingtonsa74@yahoo.com.br
São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

* Josiene Felix de Moura Macedo

Rua B, 1439 – Angelim IV, CEP- 64034-155 - Teresina - PI (Brasil)

Editora-chefe: Dra. Regina da Silva Santos/Faculdade Santo Agostinho

Artigo recebido em 02/07/2014. Última versão recebida em 05/08/2014. Aprovado em 02/10/2014.

Avaliado pelo sistema Triple Review: a) Desk Review pela Editora-Chefe; e b) Double Blind Review (avaliação cega por dois avaliadores da área).



RESUMO

Introdução: Atualmente o uso de plantas medicinais é crescente, estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem para sua utilização segura e eficaz. O teste *Allium cepa* é o teste mais utilizado em pesquisa de genotoxicidade. **Objetivo:** Avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pelo extrato de *Abelmoschus esculentus* (Quiabo) através do teste *Allium cepa*. **Metodologia:** O teste foi realizado em quatro concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) do extrato do Quiabo, onde as raízes das cebolas foram imersas e avaliadas posteriormente o crescimento das raízes e sua divisão celular no microscópio. **Resultados:** Os efeitos dos extratos do quiabo nas concentrações estudadas indicam que as doses não apresentaram redução significativa do crescimento das raízes. Na análise do índice mitótico, os extratos da espécie em estudo não afetaram a divisão celular. **Conclusão:** O extrato de *A. esculentus* não possui efeitos genotóxicos, pois todas as concentrações não causam inibição do ciclo celular.

Palavras-chave: Quiabo. *Allium cepa* L. genotoxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Due to intense use of medicinal plants, mutagenicity and toxicity studies are needed to contribute to the safe and effective use. The *Allium cepa* test is the test most frequently used in research genotoxicity **Objective:** Evaluate the genotoxic and cytotoxic effects induced by extract of *Abelmoschus esculentus* (Okra) by *Allium cepa* test. **Methodology:** The test was evaluated at four concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg / L) extract of okra, onions where the roots were immersed and subsequently evaluated the growth of roots and cell division in the microscope. **Results:** The effects of extracts of okra at the concentrations studied indicate that doses showed no significant reduction in root growth. In the analysis of the mitotic index, the extracts of this species did not affect cell division. **Conclusion:** The extract of *A. esculentus* has no genotoxic effects, as all concentrations do not cause cell cycle inhibition.

Keywords: Okra. *Allium cepa* L. genotoxicity

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o uso de plantas medicinais é promovido pelo difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, o custo dos medicamentos industrializados e tendência dos consumidores a utilizarem produtos de origem natural. De forma equivocada a população utiliza plantas medicinais de forma indiscriminada, sem se preocupar com os efeitos colaterais e/ou tóxicos (SILVA, *et al.*, 2007; AMES, 1983).

Devido a intenso uso de plantas medicinais, estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem para sua utilização segura e eficaz. O sistema teste vegetal de *A. cepa* é excelente bioindicador para o primeiro screening da genotoxicidade de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI, *et al.* 2007 LEME; MARIN-MORALES,2009).

Allium cepa é vegetal superior muito utilizado por pesquisadores em ensaios toxicológicos por meio da avaliação de parâmetros macroscópicos como alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade e ainda microscópicos como aberrações cromossômicas, pois são testes práticos, rápidos e eficientes (LONGHIN, 2008).

O *Abelmoschus esculentus*, planta da família da malva (Malvaceae), é hortaliça de clima quente e originária da África, tendo sido trazida para o Brasil pelos escravos. Segundo Shui e Peng (2004) o extrato aquoso etanólico do quiabo apresenta atividade antioxidante e os constituintes identificados para esta ação foram 3-O-xilosil-quercetina, 3-O-glicosil-quercetina e epigallocatequina. Foi registrado também o efeito anti-ulcerogênico do extrato aquoso (GÜRBÜZ, *et al.*, 2003).

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pelo extrato de *Abelmoschus esculentus* utilizando as células meristemáticas encontradas na raiz de *Allium cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento e amostra do estudo

Trata-se de estudo experimental e comparativo. A pesquisa foi realizada no laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular na sede da Faculdade Santo Agostinho na Av. Valter Alencar Nº 665, Bairro São Pedro, em Teresina-PI.

Foi utilizado 1 kg de Quiabo na preparação do extrato, posteriormente sendo divididos em quatro concentrações diferentes (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/L). E 40 cebolas para realizar o teste genotóxico, colocando 10 cebolas para cada concentração.

2.2. Preparação do extrato etanólico do quiabo.

O extrato do Quiabo foi preparado utilizando 1 kg de quiabos, cortados em rodela e desidratados na estufa á 100° C por 2 dias. Após a desidratação os quiabos foram triturados no liquidificador e pesados obtendo o valor de 195,29g. Após este processo, utilizou-se o funil de decantação. A decantação é um processo de separação que permite separar misturas heterogêneas. Utilizada principalmente em misturas bifásicas. O pó do quiabo foi misturado com etanol permanecendo por 07 (sete) dias, uma vez por dia o processo de mistura com o bastão foi feito. Após uma semana separou-se a solução do quiabo com o etanol com muito cuidado, para ser colocado no Retroevaporador da marca fision á 100°C onde a solução do quiabo foi separada do etanol num processo de evaporação.

Depois de se obter o extrato do quiabo, esta solução permaneceu na capela por 15 dias, finalizando com aspecto mais denso.

Figura 1 – (A) Quiabo cortados em rodela; (B) Quiabos desidratados após dois dias na estufa a 100°C; (C) Quiabo seco triturado no liquidificador; (D) Pesagem do pó do quiabo.



Fonte: laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular

Figura 2 – (E) Colocando o pó do quiabo no funil de decantação; (F) Funil de decantação com o pó do quiabo misturado com etanol; (G) Retroevaporador.



Fonte: laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular

2.3. Teste *Allium cepa*

Os testes realizados seguiram a proposição de Fiskesjö (1993) com pequenas modificações (MITTEREGGER *et al.*, 2007). Nos testes de toxicidade foram utilizadas cebolas de tamanho uniforme, com catafilos externos brancos, saudáveis, sem agrotóxicos e mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Antes do experimento, os catáfilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida os bulbos expostos em água de torneira por duas horas para que se reduzissem os efeitos de possíveis inibidores do brotamento. Os bulbos foram colocados para germinar sobre recipientes apropriados, com a parte inferior mergulhada na solução ou substrato em teste. Cada experimento constou de 10 (dez) bulbos, além de controle negativo (água de poço) e controle positivo utilizando solução de sulfato de cobre 0,0002 g/L.

Figura 3 – Preparação do teste *Allium cepa*. (A) Replicas das 40 cebolas descascadas; (B) Corte da raiz da cebola; (C) Cebolas imersas em água.



Fonte: laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular

Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de régua sendo desprezadas aquelas muito curtas ou muito longas. Após a mensuração, foram cortadas, sendo 1 cm do ápice das raízes, em um total de duas raízes por bulbo, sendo colocadas em solução fixadora (metanol/ ácido acético – 3: 1) durante pelo menos 24h. Em seguida, as raízes foram colocadas em etanol 70% e conservadas em geladeira até o momento da preparação histológica das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura de 20° C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta.

Figura 4 – Medição das raízes da cebola dos 10 bulbos de cada concentração.



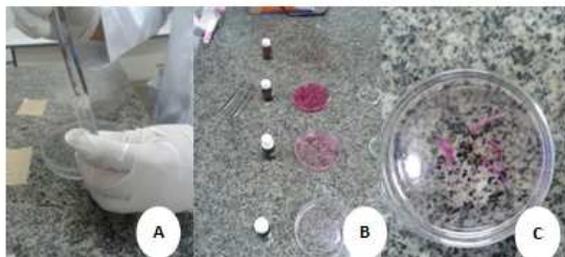
Fonte: laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular

Para o preparo das lâminas, duas a três pontas de raízes foram retiradas do etanol 70% e colocadas sobre um vidro de relógio acrescentando-se duas gotas de HCl 1N. Com a pinça e a lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Depois de 10 minutos, transferiu-se os meristemas para outro vidro de relógio, sendo adicionadas duas gotas de Carmim Acético 2% e foram deixadas para corar durante 10 minutos. Logo em seguida as pontas de raízes foram transferidas para uma lâmina. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina.

Foi então feito o *squash* (esmagamento) com o dedo polegar, com razoável pressão. Selaram-se com esmalte as bordas da lamínula para reaproveitamento do material. O material preparado foi então levado ao microscópio para observação, e posteriormente fotografado para melhor e mais eficiente leitura. A análise mutagênica constou da determinação do índice mitótico (IM), da frequência de aberrações cromossômicas (AC) no ciclo mitótico e a presença de micronúcleos em 2000 células.

O Índice Mitótico (IM), que corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, sendo analisada a presença de metáfase, anáfase e telófase. Para a análise de AC, vários tipos de aberrações foram considerados (fragmentos cromossômicos, perdas de cromossomos, pontes, atrasos, entre outros) nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase), sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único “*endpoint*”. A avaliação da toxicidade foi realizada pela medição do comprimento das raízes média. Foi realizado a análise estatística através do sistema ANOVA da média dos resultados das amostras.

Figura 5 – Preparação das laminas. (A) Retirada das Raízes das cebolas de dentro do tubo com etanol 70%; (B) e (C) Aplicação do Carmim Acético 2% nas raízes;



Fonte: laboratório de ciências farmacêuticas e laboratórios de Bioquímica e Biologia Celular

3. RESULTADOS

Os resultados para as análises tóxica, citotóxica dos extratos do quiabo em meristemas de raízes de *Allium cepa* encontram-se expressos na Tabela 1. Os efeitos dos extratos do quiabo nas concentrações de 0,5; 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL sobre o crescimento dos meristemas de raízes de *A. cepa* indicam que as doses não apresentaram redução significativa do crescimento de raízes. Os índices mitóticos das células de *A. cepa* expostas nessas concentrações do quiabo não foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CN), tanto no tratamento contínuo quanto nos descontínuos, sugerindo que os extratos das espécies em estudo não afetam a divisão celular.

Tabela 1 – Índices mitóticos da raiz em *Allium cepa* expostos a concentrações 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/L do extrato etanólico do quiabo.

Grupo	Índice mitótico (células em divisão/2000)
Controle Negativo ^a	81,80 ± 11,50
Concentração 0,5 mg/L	80,20 ± 14,18
Concentração 1,0 mg/L	78,70 ± 15,6
Concentração 1,5 mg/L	77,06 ± 12,63
Concentração 2,0 mg/L	76,18 ± 11,22
Controle Positivo ^b	44,00 ± 9,50

Tabela 2 – Aberrações cromossômicas da raiz em *Allium cepa* expostos a concentrações 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/L do extrato etanólico do quiabo.

Grupo	Aberrações Cromossômicas			
	Pontes Anafásicas	Fragmentos Cromossômicos	Atrasos Anafásicos	C-metáfases
Controle Negativo ^a	0,40 ± 0,51	0,40 ± 0,51	1,40 ± 0,51	0,20 ± 0,42
Concentração 0,5 mg/L	0,36 ± 0,5	0,49 ± 0,42	1,48 ± 0,42	0,23 ± 0,45
Concentração 1,0 mg/L	0,42 ± 1,1	0,57 ± 0,26	1,51 ± 0,54	0,26 ± 0,32
Concentração 1,5 mg/L	0,64 ± 0,5	0,64 ± 0,32	1,60 ± 0,48	0,27 ± 0,54
Concentração 2,0 mg/L	0,72 ± 0,4	0,83 ± 0,63	1,64 ± 0,53	0,29 ± 0,24
Controle Positivo ^b	0,90 ± 0,73	1,20 ± 0,91	1,70 ± 0,67	0,30 ± 0,48

Tabela 3 – Micronúcleos e comprimento (média ± desvio padrão) da raiz em *Allium cepa* expostos a concentrações 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/L do extrato etanólico do quiabo.

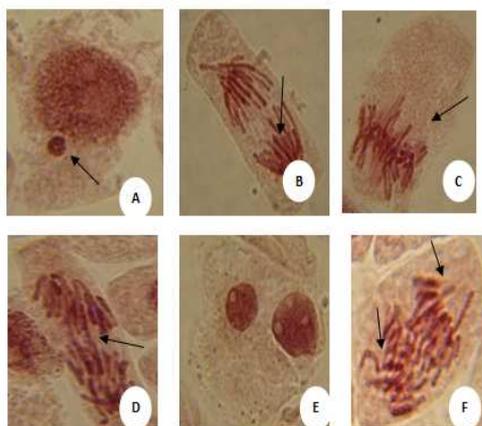
Grupo	MN/	Binucleadas/	Comprimento da raiz (cm)
	2000	2000	
Controle Negativo ^a	0,30 ± 0,48	0,20 ± 0,42	0,88 ± 0,35
Concentração 0,5 mg/L	0,42 ± 0,9	0,31 ± 0,44	0,26 ± 0,14
Concentração 1,0 mg/L	0,53 ± 0,24	0,46 ± 0,84	0,30 ± 0,63
Concentração 1,5 mg/L	1,2 ± 0,18	0,56 ± 0,35	0,34 ± 0,17
Concentração 2,0 mg/L	1,26 ± 0,41	1,1 ± 0,12	0,40 ± 0,26
Controle Positivo ^b	1,30 ± 0,48	1,20 ± 0,42	0,42 ± 0,06

Tabela 1, 2 e 3 ^a Controle Negativo= água de poço; ^b Controle positivo= sulfato de cobre 0,0002 g/L; * Diferença significativamente diferente do controle negativo ao nível de P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 (ANOVA); # Diferença significativamente diferente do ponto 1 ao nível de P<0,05 (ANOVA); £ Diferença significativamente diferente da concentração 2% mg/L ao nível de P<0,05 (ANOVA).

Os resultados para os parâmetros mutagênicos – frequência de aberrações cromossômicas, binucleadas e de micronúcleos – nas análises microscópicas observadas as seguintes aberrações cromossômicas: cromossomos soltos e em atrasos, pontes e fragmentos cromossômicos em anáfases (Figura 05). Não se observou significativa (P<0,05) aumento da frequência global de aberrações nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL. De forma similar ao exposto, não houve aumento significativo (P<0,05) na frequência global de

micronúcleos. Isso sugere a ausência de efeitos mutagênicos nos extratos etanólicos do quiabo nessas concentrações em meristemas de *A. cepa*.

Figura 06 – Raízes de *Allium cepa* crescidas em extratos do quiabo nas concentrações 0,5, 1,0, 1,5 2,0 mg/L.



Legenda: (A) célula em interfase com MN; (B) célula com atraso em anáfase; (C) C-metáfase; (D) células em anáfase com ponte; (E) célula binucleada; (F) células com fragmento, atraso e ponte em anáfase.

4. DISCUSSÃO

Os estudos toxigenéticos ocupam um lugar imprescindível na análise de fitofármacos com atividade terapêutica, tendo em vista que se encarregam de investigar a provável indução de danos genéticos, como consequência dos quais podem, ocasionar enfermidades, tais como, desenvolvimento de processos tumorais e malformações congênitas (AMES 1983).

O presente estudo foi realizado o teste de genotoxicidade do extrato de quiabo através do teste *Allium cepa*. Uma série de estudos corrobora a utilização do teste de *Allium cepa* como um ensaio importante na avaliação de genotoxicidade de extratos e infusões de plantas medicinais (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; FACHINETTO *et al.* 2007). O ensaio de *Allium cepa* é um teste de curto prazo com muitas vantagens: baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular, incluindo a avaliação de riscos de aneuploidia, além de ser sensível e de apresentar boa correlação com outros sistemas de teste. Conseqüentemente, resultados positivos no teste de *Allium cepa* devem ser considerados como um alerta e também um indicativo de que o fator químico testado pode ser um risco para a saúde do homem (FISKESJÖ, 1985).

O teste do *Allium cepa* do extrato do quiabo foi realizado em diferentes concentrações. Os efeitos tóxicos, só se manifestam em organismos se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo, em concentrações e tempo suficiente para produzir algum tipo de efeito (BARROS, 2008).

O índice mitótico foi calculado por meio da proporção entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas servindo como parâmetro para análise de citotoxicidade. Índices mitóticos significativamente menores que aqueles do controle negativo podem indicar alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos e IM maiores que o controle negativo resulta do aumento na divisão celular, podendo ser prejudicial às células, levando a proliferação celular desordenada e eventualmente, a formação de tumores (LEME; MARIN-MORALES, 2009). De acordo com o teste realizado do extrato do quiabo, observou-se que os resultados de cada concentração não foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CN), mostrando que o extrato do quiabo não afetou a divisão celular.

Aberrações cromossômicas (AC) são reconhecidas como importantes consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002), aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Estudos epidemiológicos têm mostrado pessoas com elevadas frequências de AC apresentando risco significativo de desenvolvimento de câncer (OBE, *et al.*, 2002). Analisando esse aspecto não foram encontrados uma quantidade elevada de AC nas concentrações do extrato de quiabo sobre o crescimento dos meristemas de raízes de *A. cepa*.

Um das alterações mutagênicas visíveis em microscopia óptica são pequenos corpos contendo DNA e localizados no citoplasma, são definidos como micronúcleos. Os mesmos são originados de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebras isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, podendo, em cada célula, aparecer mais de uma vez (RIBEIRO, *et al.*, 2003).

O teste micronúcleo, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico. Representando uma maneira simples e precisa, de estimar danos genéticos induzidos (MACGREGOR, *et al.*, 1987; HAYASHI, *et al.*, 1994). No teste realizado com extrato do quiabo não houve aumento significativo na frequência global de micronúcleos. Isso sugere a ausência de efeitos mutagênicos nos extratos etanoicos do quiabo nessas concentrações em meristemas de *A. cepa*.

A toxicidade foi avaliada pelo controle de crescimento das raízes e de sua morfologia, obtendo-se comprimento médio próximo ao nível controle, não indicando efeito tóxico. A toxicidade é indicada pela diminuição do crescimento das raízes. Não se encontrou na literatura estudos similares e isto é compreensível, tendo em vista que a preocupação com o

possível efeito danoso das plantas medicinais é relativamente novo. Ainda existem varias plantas medicinais em estudo.

Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam sequestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA. Dietas ricas em frutas e hortaliças parecem estar ligadas a baixas taxas de incidência de câncer, pois os vegetais contêm componentes fenólicos, flavonóides, isoflavonas, terpenos, glicosinolatos, minerais e outros compostos que teriam função antioxidante e anticarcinogênica (BERRINO, *et al.*, 2003).

Segundo Shui e Peng (2004) o extrato aquoso etanólico do quiabo apresenta atividade antioxidante e os constituintes identificados para esta ação foram 3-O-xilosil-quercetina, 3-O-glicosil-quercetina e epigallocatequina.

5. CONCLUSÃO

O extrato do quiabo analisado em diferentes concentrações, não apresentou significancia nos resultados de indice mitótico, aberrações cromossomicas, micronúcleos e no crescimento de suas raízes, ou seja não apresenta efeitos de mutagenicidade nem em baixas ou altas concentrações. Ausência de indícios de toxicidade do quiabo nos quatros concentrações testados sugere que essa planta pode ser utilizada pela população.

REFERÊNCIAS

AMES, B.N. **Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases.** Science, v. 221, .2, p. 1256-1264, 1983.

BAZÁN, U.R.A. **Avaliação de germoplasmas de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*) quanto à resistência ao Oídio (*Erysiphechioracearum*).** Tese doutorado, UNESP, p.59, 2006.

BAGATINI, M. D; SILVA, A. C. F; TEDESCO, S. B. **Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais.** Rev Bras Farmacog, v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares.** 2006. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>, acesso em 05 de mai. 2014.

BERRRINO F, KROGH V, RIBOLI E. **Epidemiology studies on diet and cancer.** Tumori, v.89, p. 581-585, 2003.

CUCHIARA, C C; BORGES, C S; BOBROWSKI, V L. **Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água.** Tecnol. Ciên Agropec. João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, mar. 2012

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais verdades e mentiras O que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber.** São Paulo: UNESP, 2007.

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

FISKESJÖ, G. **The *Allium* test: a standard in environmental monitoring.** *Hereditas*, v.102, p.99-112, 1985.

G. SHUI, L.L. PENG. **An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn.** *J. Chromatogr. A*, v.1048 pg. 17–24, 2004.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. **Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective.** *Mutation Research*, v. 455, p. 21-28, 2000.

HAYASHI, M.; TICE R. R; MACGREGOR J. T. **In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay.** *Mutation Research*, v.312, p.293-304, 1994.

IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277, jul./dez. 2008.

JAIN, N.; JAIN, R.; SURENDRA, J. **A review on : *Abelmoschus esculentus*, Pharmacia**, vol.1 , p.300-302 , 2012.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. ***Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application.** *Mutation Research*, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574209000404>>. Acesso em: 01 Abr. 2014.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos.** Tese de Doutorado submetida ao Programa de Doutorado em Química, do Instituto de Química da Universidade de Brasília. 2008.

MITTEREGGER, H. J. *et al.* **Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries.** *Chemosphere* v. 67, p.1211–1217, 2007.

NATARAJAN, A.T. **Chromosome aberration: past, present and future.** *Mutation Research*, v.504, p.3-16, 2002.

OBE, G. *et al.* **Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution.** *Mutation Research*, v.504, p.17-36, 2002.

RIBEIRO, M. L. G; SILVA, J. H. V; DANTAS, M. O. **Exigências nutricionais de lisina para codornas durante a fase de postura, em função do nível de proteína da ração.** Rev Bras Zoot, v.32, n.1, p.156-161, 2003.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. **Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde.** Ciências & Saúde Coletiva, v, 16, n. 1, p. 311 - 318 2011.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance. 344 p. 2003.

SILVA, G. N. *et al.* **Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology, v.104, p. 58-61. 2007.

TAUFNER C.F; FERRAÇO E.B ; RIBEIRO LF. **Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES.** Natureza on line , v.4, n.1, p. 30-39, 2006.