

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA
DATURNERA ULMIFOLIA L. (CHANANA) EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

**EVALUATION TOXICITY, CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND MUTAGENIC
OF TURNERA ULMIFOLIA L. (CHANANA) IN EUKARYOTIC CELLS**

ANNA ERIKA PINHEIRO DA SILVA

Graduada em Farmácia Faculdade Santo Agostinho

E-mail: annaerika_pinheiro@hotmail.com

JOSÉ WENDELL DE MIRANDA MOURA

Graduado em Farmácia Faculdade Santo Agostinho

E-mail: jwendellmiranda@gmail.com

MANOEL PINHEIRO LÚCIO NETO

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Piauí

Professor da Faculdade Santo Agostinho

E-mail: manoelplucio@hotmail.com

Endereço: MANOEL PINHEIRO LÚCIO NETO

Avenida Valter Alencar, São Pedro, 64000-000 - Teresina, PI – Brasil

Editora-chefe: Dra. Regina da Silva Santos

Artigo recebido em 18/11/2014. Última versão recebida em 07/01/2015. Aprovado em 08/01/2015.

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



RESUMO

A natureza nos aponta várias possibilidades de estudos e a que mais nos chamou atenção foi a *Turnera ulmifolia* L., popularmente conhecido no Brasil como Chanana. As plantas não foram suficientemente estudadas, no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste *Allium cepa*. O objetivo foi analisar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e/ou mutagênicos do extrato aquoso de raízes da *Turnera ulmifolia* L. em células eucarióticas através do teste *Allium cepa*. O teste *Allium cepa* foi realizado segundo descrição de Fiskesjo (1985), com algumas adaptações, conforme descrito por Mitteregger *et al.* (2007), cada grupo experimental constatou do extrato nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 g/L. Como controles negativo (água sem cloro) e positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL). Cada experimento constatou de 05 bulbos. Cada solução foi distribuída em recipientes de vidro, em contato com o extrato, sendo deixado para germinar por 72 h. Um total de 1250 células por cada bulbo, foram examinadas ao microscópio. Os seguintes parâmetros foram observados: índice mitótico (250 células/lâmina); aberrações cromossômicas no ciclo mitótico; e presença de micronúcleo. Os resultados mostraram que a planta não possui riscos na concentração de 12,5 g/L, porém, a concentrações maiores já apresentara toxicidade e citotoxicidade. Dessa forma, conclui-se que o extrato aquoso da *Turnera ulmifolia* L., na concentração usual pela população que é de 50g/L possui ação tóxica aos que dela fazem uso.

Palavras - chave: *Turnera ulmifolia* L. Toxicidade. Citotoxicidade. Mutagênicidade. *Allium cepa*.

ABSTRACT

Nature shows us several possibilities and studies that drew the most attention was the *Turnera ulmifolia* L., popularly known in Brazil as Chanana. The plants were not sufficiently studied in regard to their cytotoxic / mutagenic potential, which can be monitored by use of the test system *Allium cepa*. The aim was to analyze the possible toxic effects, genotoxic and / or mutagenic effects of aqueous extract of roots of *Turnera ulmifolia* L. in eukaryotic cells by *Allium cepa* test. The *Allium cepa* test was performed according to the description Fiskesjo (1985), with some adaptations, as described by Mitteregger *et al.* (2007), each experimental group found extract at concentrations of 12.5; 25; 50; 100 and 200 g / L. As a positive (copper sulfate 0.0006 mg / ml) negative control (water without chlorine) and. Each experiment found 05 bulbs. Each solution was distributed in glass containers in contact with the extract, being left to germinate for 72 h. A total of 1250 cells per bulb, were examined under the microscope. The following parameters were observed: mitotic index (250 cells / slide); chromosomal aberrations in the mitotic cycle; and the presence of micronuclei. The results showed that the plant hasn't risks in the concentration of 12.5 g / L, but higher concentrations had already submitted toxicity and cytotoxicity. Thereby, it is concluded that the aqueous extract of *Turnera ulmifolia* L. in the usual concentration of population that is 50 g / L has toxic action those whom employ them.

KEYWORD: *Turnera ulmifolia* L. Toxicity. Cytotoxicity. Mutagenicity. *Allium cepa*.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Alves 2009 as plantas medicinais possuem propriedades terapêuticas, e são amplamente utilizadas na medicina popular de forma empírica contra várias patologias. O uso destas vem crescendo gradativamente ao longo dos últimos anos devido a diversos fatores, como o baixo poder aquisitivo da maioria da população que procura a medicina alternativa, e custos reduzidos. E isso contribui direta ou indiretamente para o descobrimento de novos fármacos.

Segundo Lima 2007, a natureza nos aponta várias possibilidades de estudos e a que mais nos chamou atenção foi a *Turnera ulmifolia* L., uma planta herbácea com folhas pubescentes e flores amarelas pertencentes à família Turneraceae, popularmente conhecido no Brasil como Chanana. Esta apresenta raiz axial, caule sublenhoso, folhas simples pecioladas, filotaxia alterna espiralada, sendo a presença de glândulas de Turnera a característica marcante do grupo. A prefloração é contorcida, a flor actinomorfa, heteroclamídea, apresentando estipulas e o fruto é capsular seco. Apresenta ovário súpero, unilocular e tricapelar e placenta parietal.

Em seus constituintes químicos a raiz da Chanana apresenta saponinas, flavonóides, taninos, polifenóis, carboidratos, esteróides e triptenóides, gomas e mucilagens e possui característica adstringente, ácido tânico, cafeína, damianina, óleo essencial, pepsina, princípios amargos e resinas.

Cerca de 60-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional dependem essencialmente de plantas para cuidar de sua saúde. Entretanto, mesmo as diversidades genéticas vegetais mundiais sendo bastante expressiva, poucas espécies (15 a 17%) têm sido cientificamente estudadas para a avaliação de suas qualidades, segurança e eficácia. Os organismos vivos estão frequentemente expostos às substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares. Os danos podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (BAGATINI, SILVA, TEDESCO, 2007).

Para Bonassi (2007) a prescrição de um novo fármaco o conhecimento da relação risco/benefício é de fundamental importância, uma vez que dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar e a possível ocorrência de efeitos

cancerígenos, e devido o não conhecimento, podem ser excluído ou passar despercebidos. Para se ter uma boa avaliação do risco potencial em seres humanos de efeitos genotóxicos e cancerígenos, as autoridades reguladoras da Europa, EUA e Japão recomendam que estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade sejam realizados antes do pedido de aprovação de comercialização de produtos farmacêuticos visando à segurança, qualidade e eficácias dessas novas moléculas que poderão ser futuros fármacos.

Segundo Bagatini, Silva e Tedesco (2007), as plantas não foram suficientemente estudadas, no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste *Allium cepa*. Os biomarcadores são úteis e podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico. Estes têm sido indicados como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade devido a determinadas características, como sua cinética de proliferação, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio, por possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho e seu baixo custo.

As mutações são divididas basicamente em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA do indivíduo e as cromossômicas, são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas por análises citogenéticas celulares, onde essas alterações cromossômicas podem ser reparadas pela própria célula, sem tantos danos maiores ao indivíduo (LUCIO NETO, 2011).

O objetivo foi analisar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e/ou mutagênicos do extrato aquoso de raízes da *Turnera ulmifolia* L. em células eucarióticas através do teste *Allium cepa*.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Plantas medicinais

Segundo Argenta(2011), essas espécies utilizadas na sabedoria popular têm se tornado objeto de estudo em muitos países e tem se tornado uma fonte importante de

produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos, das mais diversas plantas, para as mais diversas doenças. Atualmente, cerca de 13.000 plantas são usadas como fármacos ou para a síntese de moléculas medicinais. Estratégias modernas, na descoberta de novos fármacos na década de 80, baseadas no mecanismo de ação e modelagem molecular (*computer assisted drug design*, CADD), que permitam prever e explicar, ao menos teoricamente, as propriedades farmacológicas das moléculas. Essa mudança fez com que o estudo com plantas medicinais, pelo meio científico, indústria farmacêutica e órgãos de fomento, ficasse em segundo plano, embora grande parte da população dos países em desenvolvimento continuasse usando plantas ou preparações destas nos cuidados básicos de saúde, mesmo sem saber os possíveis riscos que ao se fazer uso das mesmas estão correndo.

Uma grande parte da composição química das plantas de uso medicinal ainda é desconhecida pela ciência, e dados recentes afirmam que cerca de 99% das plantas medicinais endêmicas do Brasil ainda não têm seus princípios ativos identificados, o que representa um grande potencial farmacológico e econômico a ser explorado, tornando-se imprescindível à avaliação das potencialidades químicas das plantas brasileiras, em especial as espécies vegetais da região amazônica, onde a grande maioria dessas plantas não foram estudadas do ponto de vista químico e outras ainda nem foram catalogadas pela ciência (FÃO, *et al* ,2012)

Aplicação das plantas medicinais pela população

Os remédios populares, baseados principalmente em plantas, desfrutam de uma posição respeitável hoje, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitado. Seguros, eficazes e de baixo custo remédios indígenas estão ganhando popularidade entre as pessoas de ambas as áreas urbanas e rurais. Informações de grupos étnicos em medicina tradicional indígena tem desempenhado um papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas como agentes quimioterapêuticos (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007).

Segundo Agra, *et al.*, 2007, o principal ecossistema do Nordeste do Brasil é o bioma "caatinga", uma palavra indígena, que significa "floresta aberta", assim chamado por causa de sua aparência durante a estação seca. Ele consiste de extensas planícies semi-áridas encontrados principalmente na região Nordeste, do Piauí ao norte de Minas Gerais, com exceção do Estado do Maranhão, que não tem "caatinga". As plantas na

área circundante são parte integrante da cultura dessas pessoas e as informações sobre as plantas é passada de geração em geração.

Toxicidade de plantas medicinais

Segundo Pinho, *et al* (2010), geralmente as plantas são empregadas para fins medicinais, onde sua toxicidade é um problema sério de saúde pública; visto que os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem com a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente e dificilmente são relatados por seus usuários. As pesquisas realizadas para a 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.

E por analogia, podemos dizer que cada vegetal é um frasco contendo vários medicamentos diferentes, devido a esse fato, devemos ressaltar que cada princípio que é considerado como terapêutica também podem ter atividades tóxicas. O uso terapêutico dessas plantas envolve várias etapas que vão desde o cultivo até a administração; embora essas plantas sejam popularmente consideradas terapêuticas, frequentemente possuem propriedades tóxicas desconhecidas pela população (BOCHNER, 2012).

Algumas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo o processo germinativo bem como o processo de divisão celular. Estes compostos são conhecidos como alelopáticos. O termo alelopatia refere-se à capacidade que as plantas têm de interferir no desenvolvimento de outras plantas, por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou, quase sempre, no solo. O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (IGANACI, 2006).

Turnera ulmifolia L. (chanana)

Teixeira e Melo (2006), diz que a Chanana (*Turnera ulmifolia* L.) é uma planta daninha da família das turneráceas, com forte indício de propriedades inibitórias de crescimento de outros vegetais. O extrato da Chanana tem se tornado referencial para pacientes portadores do câncer, principalmente após sessões de radioterapia e quimioterapia, onde a tintura começou a ser ingerida, como método de tratamento alternativo. Segundo relatos, há pacientes que perceberam diminuição de sensação de

mal-estar e vômito que a radioterapia e a quimioterapia causam. Outra ideia trabalhada é o tratamento de doenças resultantes do baixo sistema imunológico do portador do vírus como: diarreias (utilizando tintura de aixeta), pneumonias com xarope de urucum, dores musculares, cravo de defunto, alergias urtiga branca.

A *T. ulmifolia* L. é uma das espécies vegetais utilizadas como terapêutica popular. É uma planta encontrada em diversas partes do mundo, no Brasil, é conhecida como chanana ou damiana, ela é de fácil cultivo e bastante adaptável aos diversos climas, podendo resistir até uma temperatura de 85°C em algumas ocasiões. As plantas que compõem a família Turneraceae são típicas de florestas úmidas, campos e jardins tropicais, por isso, são consideradas como erva daninha. A *T. ulmifolia* L. é um arbusto denso perene, com folhas lanceoladas, oblonga lanceolada ou estreita-elíptica. Suas flores são formadas por pétalas que variam do amarelo a brancas amareladas de cor marrom na base. Através de sua beleza e exuberância esta planta é utilizada como ornamento em países tropicais. A chanana pode ser ainda usada no combate a úlceras gástricas e duodenais, segundo a medicina popular (SILVA, e CATANHO, 2011) (Figura 01)

Figura 01: *Turnera ulmifolia* L. (chanana).



Fonte: <http://www.oparnaiba.com/artes/2014/08/170-anos-da-parnaiba-eravidade-das-xananas.html>

Raiz subterrânea pivotante, não possuindo tipos especiais; caule herbáceo, de ramos eretos cilíndricos castanhos esverdeados, liso, sem desprendimento e adaptações; folhas herbáceas, simples, elípticas, pecioladas, face adaxial pilosa e rugosa pór as nervuras serem salientes, ápice agudo, base cuneado apresentando um par de nectários extraflorais, margem serreada, venação penínérvea, eucampdodroma, com venação terciária perpendicular, filotaxia alterna espiralada, brácteas lineares. Inflorescência flores solitárias axilares em racemo; flor heteroclamídea, andrógina, actinomorfa (LIMA et al, 2007).

Teste *Allium cepa*

Segundo Bagatini, Silva e Tedesco(2007), o método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de plantas medicinais através de testes *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais, aondeas principais alterações vão desde efeitos como mutagenicidade e antimutagenicidade, até aumento e diminuição da proliferação celular de pontas de raízes.

Segundo Ferreira, *et al* (2009), os testes de toxicidade como *Allium cepa* estão inseridos nos estudos pré-clínicos, onde os mesmos possuem como objetivo principal avaliação toxicológica que está diretamente relacionado com seu uso terapêutico. Neste estágio torna-se importante ainda a avaliação dos efeitos do composto sobre a fertilidade e a reprodução, testes de genotoxicidade, testes para mutagenicidade e citotoxicidade. Também são realizados nesta fase testes relacionados com a estabilidade no novo composto, possibilidade de produção em larga escala bem como estudos de formulação, tentando minimizar ou erradicar possíveis danos que possam surgir em seus usuários, garantindo assim maior eficácia e credibilidade desse vegetal.

Citotoxicidade

As substâncias presentes no ambiente que sejam potencialmente danosas ao organismo humano caso sejam assimiladas, ou até mesmo as substâncias sintéticas farmacológicas antes de chegarem ao comércio, necessitam de investigação quanto ao nível de risco que possam apresentar. Ao longo dos anos, vários modelos de testes têm sido desenvolvidos como métodos de avaliação. Os ensaios usualmente utilizados detectam o potencial risco citotóxico/ genotóxico no organismo. A citotoxicidade é basicamente medida pela taxa de crescimento celular, podendo ser observada macroscopicamente (FIGUEREDO, 2014).

O índice mitótico e algumas anomalias nucleares são utilizados para avaliar citotoxicidade e análise de micronúcleos para verificar mutagenicidade de substâncias químicas diferentes. Além disso, o sistema de teste *A. cepa* fornece informações importantes para avaliar mecanismos de ação de um agente sobre seus efeitos sobre o material genético (clastogênico e / ou efeitos aneugênicos), como podemos observar na ilustração 02 (LÚCIO NETO, 2011).

O uso do bio indicador *A. cepa* para testes de citotoxicidade foi validado por muitos pesquisadores que realizaram de forma conjunta testes em animais *in vivo*, obtendo resultados similares propiciando informações valiosas para a saúde humana. Além de sua alta sensibilidade e relação custo-benefício, a utilização do teste com *A. cepa* oferece algumas vantagens adicionais, incluindo a possibilidade de medição de parâmetros macroscópicos e microscópicos e uma boa correlação com resultados de sistemas de teste com mamíferos (DIAS, 2014).

Mutagênicidade

Mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos, entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente sintonizados de um organismo (SILVA, et al, 2011).

As mutações podem ser observadas através da formação de micronúcleos que são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma, se manifestam em células por divisão, formados a partir dos resultados de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (ilustração 04). Um cromossomo inteiro ou fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (MENEGUETTI, 2011).

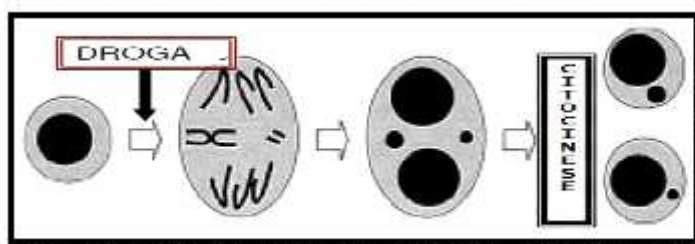
Genotoxicidade

O efeito mutagênico e carcinogênico de genotóxicos agentes em populações humanas que estão expostos ocupacionalmente e acidentalmente ou por estilo de vida tem sido uma preocupação crescente (MALUF, ERDTMANN, 2000). Segundo Dias, et al (2014), sistemas testes vegetais, principalmente o de *A. cepa*, têm sido utilizados para

estudos preliminares dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção do potencial de genotoxicidade, servindo como primeira triagem de detecção dessa alteração.

De acordo com Lucio neto (2011, apud FENECH, p. 51), a formação de MN durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido a lesões não reparadas ou reparadas de forma incorreta, ou, ainda, devido à má segregação dos cromossomos ou má função mitótica. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição aos agentes clastogênicos e aneugênicos e essa heterogeneidade reflete a presença de múltiplas exposições externa e interna e ao grande número de alterações cromossômicas que, eventualmente, resulta na formação de micronúcleos, como podemos observar na Figura 02.

Figura 02: Formação de micronúcleos em células eucarióticas



Fonte: Meneguetti, 2011.

2 METODOLOGIA

2.1 Tipo de Estudo

Trata-se de uma pesquisa quantitativa de caráter experimental. Segundo Lakatos (2011), quantitativa porque faz o uso de amostras amplas de informações numéricas, podendo apresentar seus resultados em gráficos ou tabelas, quantificando de forma sistematizada o objeto a ser estudado.

Segundo Cervo, Bervian e Silva (2007), pesquisas experimentais são caracterizadas por manipular diretamente as variáveis relacionadas com o objeto de estudo, a manipulação das variáveis proporciona o estudo da relação entre as causas e os efeitos de determinado fenômeno; com a criação de situações de controle, procura-se evitar a interferência de variáveis, onde essa interferência pode estar diretamente ligada à realidade ou manipulando a variável independente, a fim de observar o que acontece com a dependente.

2.2 Condições de crescimento das raízes, concentrações do ensaio e tratamentos

O teste *Allium cepa* foi realizado segundo descrição de Fiskesjo (1985), com algumas adaptações, conforme descrito por Mitteregger (2007), cada grupo experimental constatou do extrato aquoso das raízes de *Turnera ulmifolia* L. nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 g/L. Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, água sem cloro e sulfato de cobre 0,0006 mg/mL.

Essas concentrações foram escolhidas baseadas na utilização de forma empírica pela população que é de 50 g/L (4 a 5 raízes) com isso, foram analisadas concentrações maiores e menores para possíveis detecções de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Bulbos de cebolas da espécie *Allium cepa* L. (2n=16; diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, foram adquiridos comercialmente no mercado velho em Teresina-PI, Brasil, foram mantidos em locais livres de umidade e ao abrigo da luz. Antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água de torneira por duas horas para reduzir os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Cada experimento se constatou de 05 (cinco) bulbos. Cada solução foi distribuída em recipientes de vidro, previamente esterilizados, de capacidade de 5 mL e um bulbo foi colocado em cada recipiente com a área radicular em contato com a solução, sendo deixado para germinar a 18–22°C (KOVALCHUK *et al.*, 1998). O volume de solução absorvido foi repostado diariamente, objetivando a manutenção das raízes mergulhadas. Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de régua, desprezando aquelas muito curtas ou muito longas, os tamanhos das raízes foram utilizadas como um índice de toxicidade. Após a mensuração, foram cortadas de 1,5 a 2,0 cm do ápice das raízes, em um total de três raízes por bulbo. Se colocou em solução fixadora de Carnoy (metanol 99%/ ácido acético glacial– 3: 1 v/v) durante 24h e, após, em etanol 70%, conservando-se em refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada de 20°C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta (FESKEJO, 1985).

2.3 Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, duas a três raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min) e hidrolisadas em HCl 1N a 60° C por 8 min. Logo após foram transferidas, as raízes, para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff (fuccina básica/metabissulfio de sódio – 3:1 p/p), por aproximadamente 2 horas. 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 se adicionou duas gotas de carmim acético 2% e se deixou corar durante 10 minutos. Logo em seguida as pontas das raízes foram transferidas para uma lâmina. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina. Foi então, realizado o *squash* (esmagamento) com o dedo polegar, com razoável pressão. O material preparado foi levado ao microscópio para observação, e posteriormente fotografado para melhor e mais eficiente leitura.

2.4 Análises tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica

Um total de 1000 células por cada bulbo foram examinadas ao microscópio (objetiva de 100x com óleo de imersão). Os seguintes parâmetros foram observados: (a) índice mitótico (IM) (250 células por lâmina); (b) aberrações cromossômicas (AC) no ciclo mitótico; e (c) presença de micronúcleo (MN) (250 células por lâmina). O IM corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, analisada, também, a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase. Para a análise de AC, vários tipos de aberrações, cromossomos soltos e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos, e todos os registros foram reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único “*endpoint*”.

2.4.1 Amostra do Estudo

A amostra de estudo foi extraída a partir das raízes da planta Chanana (*Turnera ulmifolia* L). que é uma planta herbácea com folhas pubescentes e flores amarelas pertencente à família Turneraceae, sua raiz é axial, caule sub-lenhoso, filotaxia alterna espiralada, com a presença de glândulas de Turnera a característica marcante do grupo. Extrato aquoso das raízes da *T. ulmifolia* L. (Chanana) será a nossa amostra.

2.4.2 Amostragem do estudo

Segundo Cervo, *et al* (2007), amostragem é quando a pesquisa procura estabelecer generalizações a partir de observações em grupos ou conjuntos de indivíduos chamados de população ou universo. É a coleta de dados de uma parte dessa população que selecionada segundo critérios que garantam sua representatividade.

A amostragem para determinação das concentrações a serem utilizadas no teste *A. cepa* foram realizadas de acordo com informações obtidas pela população, que faz uso de forma empírica, em torno de 50 g/L, logo, para efeito de análises serão utilizados concentrações menores e maiores. Cada grupo experimental constatou do extrato aquoso da *Turnera ulmifolia* L. nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 g/L. Como controles negativo e positivo serão utilizados, respectivamente, água sem cloro e sulfato de cobre 0,0006 mg/mL.

2.5 Instrumento de Coleta de Dados

Coleta de Dados

A planta *Turnera Ulmifolia* L.(Chanana) foi coletada em uma plantação no Bairro Jacinta Andrade, Teresina – PI, no horário da manhã e água filtrada encontrada no Laboratório de Biologia Geral da Faculdade Santo Agostinho – FSA.

Preparo da amostra

Para o preparo das amostras foram utilizadas raízes de *Turnera ulmifolia* L. (chanana), onde a extração foi realizada com água. Para a concentração de 50g/L (quantidade usada de forma empírica pela população) foram utilizadas de 4 a 5 raízes, a filtração se deu com o auxílio de papel filtro; o mesmo procedimento foi executado para todas as amostras nas concentrações de 12,5; 25; 100 e 200 g/L.

Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o programa Graphpad PRISMA versão 5.0, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$.

Crêterios de Inclusão e Exclusão

Para a escolha das cebolas, foram utilizados como critérios de inclusão: osbulbos de cebolas da espécie *Allium cepa L.* que apresentarem (2n=16; diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis. E foram excluídas as cebolas que não apresentarem tais características.

Para escolha e inclusão das raízes, foram levadas em considera o seu estado de conserva o, colora o características e devem ter sido colhidas nos dias das análises. Foram excluídos qualquer outra parte da planta como: folha, caule ou flores; aparência estranha ou não com presença de objetos estranhos ou não.

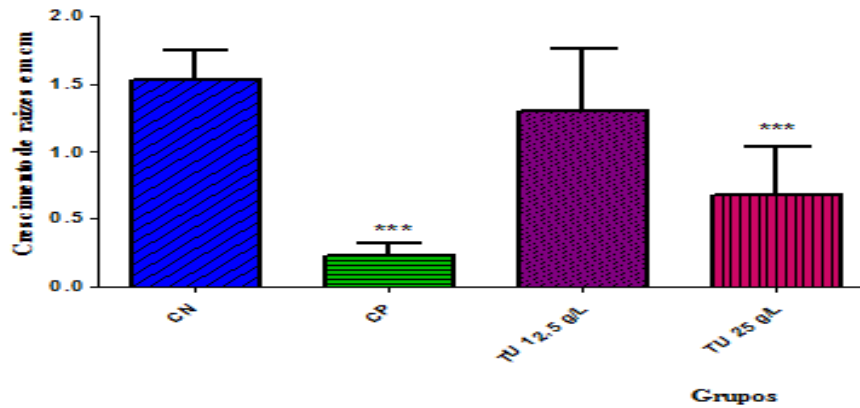
3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Segundo Belcavelo, *et al* (2012), as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, mais diversificados constituintes químicos possíveis, muitos dos quais são utilizados para a produ o de um grande número de fármacos, e outros nem estudados. As prepara es fitoterápicas correspondem a 25% do receituário médico dos países desenvolvidos e 80% dos países em desenvolvimento; apesar do amplo uso dos fitomedicamentos pela popula o, poucos estudos têm sido feitos para avaliar a eficácia terapêutica e a toxicidade, citotoxicidade das prepara es fitoterápicas e o uso de prepara es a base de plantas, ao contrário do senso comum, que as classifica como sendo naturais e isentas de rea es adversas, podem apresentar vários agravos   saúde incluindo rea es alérgicas, tóxicas, intera es medicamentosas e efeitos mutag nicos.

Nos experimentos utilizou-se, além do controle negativo ( gua sem cloro) e do controle positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL), e o extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.* nas concentra es de 12,5; 25; 50; 100 e 200 g/L (Figura 03)

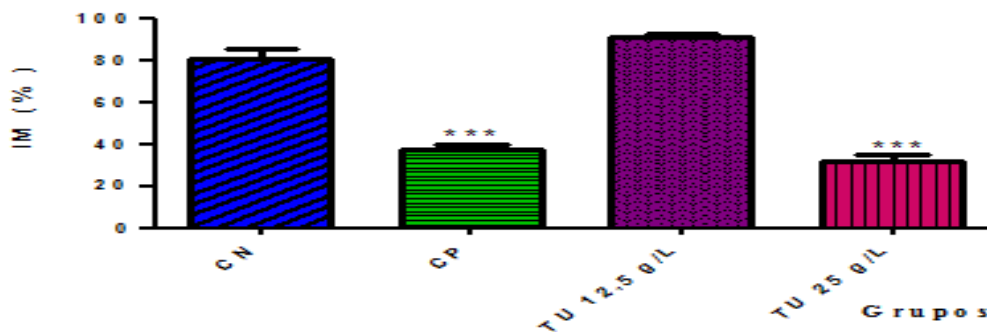
Os efeitos do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.* nas concentra es de 12,5 e 25 g/L sobre o Crescimento das Raízes e o  ndice Mitótico (IM) encontram-se expressos nas figuras 1 e 2 e na Tabela 1. Ambos os parâmetros na concentra o de 12,5 g/L não apresentaram redu o significativa, o que não foi observado para a dose de 25 g/L, onde foi evidenciada diferença estatisticamente significante em rela o ao controle negativo ($P < 0,0001$) para ambos os parâmetros (Figura 04)

Figura 03: Crescimento das raízes (cm) em espécimes de *Allium cepa* expostos, respectivamente, às concentrações de 12,5 e 25,0 g/L do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.** Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$ (ANOVA).



Fonte: Laboratório de Biologia Geral da FSA. 2014

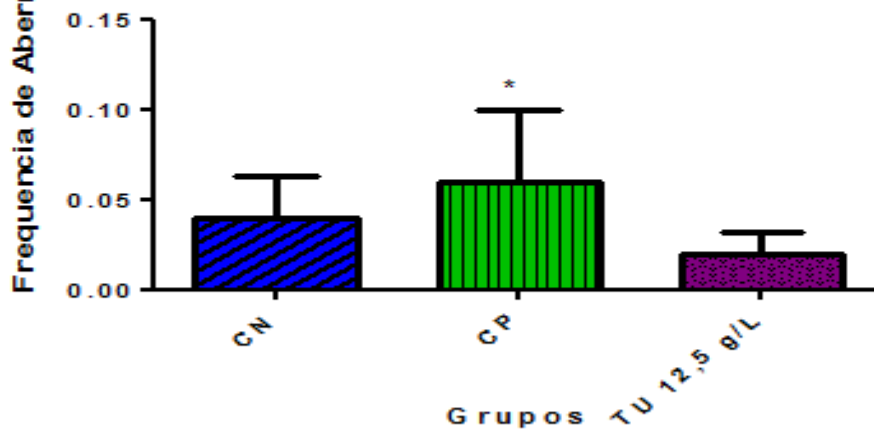
Figura 04: Índice Mítico (IM) em espécimes de *Allium cepa* expostos, respectivamente, às concentrações de 12,5 e 25,0 g/L do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.** Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$ (ANOVA).



Fonte: Laboratório de Biologia Geral da FSA. 2014

No experimento realizado na concentração de 25 g/L, a análise no tamanho das raízes dos organismos expostos foi condizente com a inibição do IM, o que vem a constatar que a inibição do IM induziu a uma redução significativa no crescimento das raízes *** $P < 0,0001$ (ANOVA), como mostra nas Figuras 1 e 2, tendo indícios de toxicidade e citotoxicidade celular, o que indica que essa concentração interfere no processo de síntese do DNA; o que não ocorreu na concentração de 12,5 g/L (Figura 05 e Figura 06))

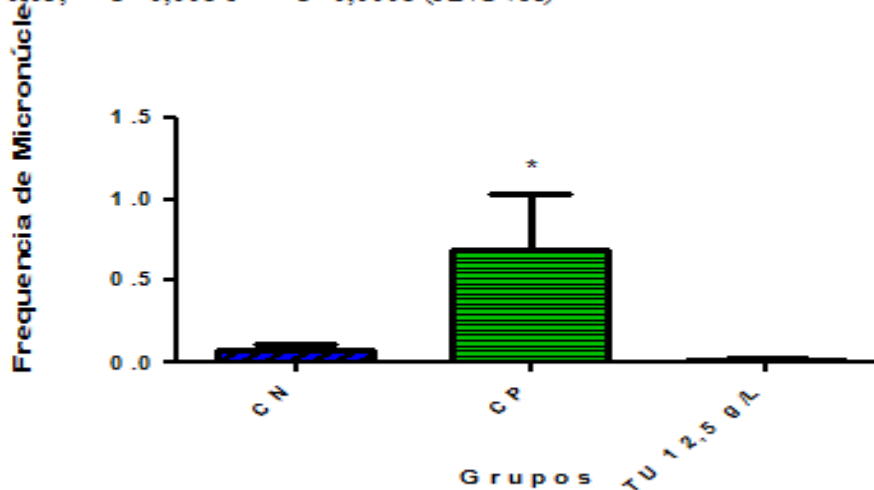
Figura 05: Frequência de Aberrações (FA) em espécimes de *Allium cepa* expostos, respectivamente, às concentrações de 12,5 e 25,0 g/L do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.* * Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$ (ANOVA).



Fonte: Laboratório de Biologia Geral da FSA. 2014

Nas concentrações de 50; 100 e 200 g/L a inibição do crescimento das raízes foi total, nos impossibilitando assim a observação de possíveis alterações cromossômicas que as mesmas possam apresentar (Figura 06).

Figura 06: Frequência de micronúcleos (MN) em espécimes de *Allium cepa* exposto, respectivamente, às concentrações de 12,5 e 25,0 g/L do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia L.* * Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$ (ANOVA)

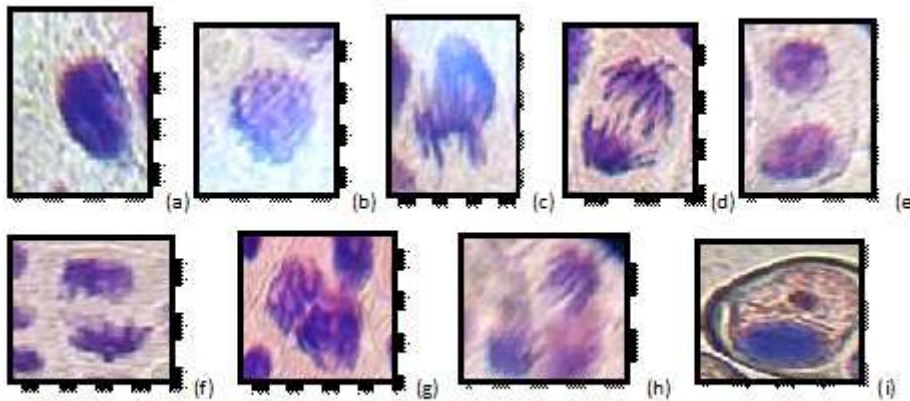


Fonte: Laboratório de Biologia Geral da FSA. 2014

Os resultados encontrados para as diferentes Aberrações Cromossômicas (AC) encontram-se expressos na Tabela 1, figuras 7, f, g e h. Nas análises, foram

consideradas como AC: cromossomos soltos e atrasos anafásicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos.

Figura 07: Fases do ciclo celular (divisão mitótica) da espécie *Allium cepa*, exposto a concentração 12,5 do extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia* L.



Legenda: (a) interfase, (b)prófase, (c)metáfase, (d)anáfase, (e)telófase, diferentes tipos de Aberrações Cromossômicas (AC) (f,g,h - atrasos anafásicos) e Micronúcleos (i).

Tabela 1. Índice mitótico, aberrações cromossômicas, micronúcleos e comprimento das raízes em espécimes de *Allium cepa* expostos, respectivamente, às concentrações de 12,5 e 25 g/L do extrato aquoso de *Turnera Ulmifolia* L.

Grupo	Índice mitótico (células em divisão/250)	Aberrações Cromossômicas				Células micronucleadas (MN/250)	Comprimento da raiz (cm)
		Pontes Anafásicas	Fragmentos Cromossômicos	Atrasos Anafásicos	Cromossomos Soltos		
Controle Negativo ^a	80,90 ± 10,45	0,02 ± 0,04	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,12 ± 0,08	1,53 ± 0,21
Controle Positivo ^b	37,00 ± 8,07***	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,48 ± 0,32*	0,96 ± 0,52*	0,22 ± 0,09***
12,5 g/L	90,93 ± 3,94	NO	NO	0,02 ± 0,03	NO	0,02 ± 0,03	1,3 ± 0,46
25 g/L	31,83 ± 5,00***	NO	NO	NO	NO	NO	0,67 ± 0,36***

^aControle Negativo= água sem cloro; ^b Controle positivo= sulfato de cobre 0,0006 mg/mL; ^c Incluindo pontes, fragmentos, cromossomos soltos e atrasos; NO = não observado; * Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA).

O número de evidências relatando os efeitos biológicos dos extratos de plantas está constantemente aumentando. A composição desses extratos naturais que aparentemente exibem apenas propriedades benéficas inclui componentes químicos com atividades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. Se os componentes genotóxicos estão presentes, eles podem intercalar-se com a molécula de DNA levando a danos genéticos em regiões de fundamental importância para o controle do ciclo celular e apoptose, acelerando o processo neoplásico. Dessa forma, é muito importante a

inclusão da abordagem genotóxica em avaliações toxicológicas dos compostos terapêuticos (FERREIRA, *et al*, 2008).

O uso de preparações a base de plantas, ao contrário do senso comum, que as classifica como sendo naturais e isentas de reações adversas, podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos. Diversos grupos de plantas possuem substâncias bioativas de interesse farmacológico. No Brasil, e em outros países, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais(BELCAVELLO, 2012).

O Teste *Allium cepa* fornece dois tipos de toxicidade. Parâmetros macroscópicos que podem ser observados consistem em formação de tumores, avaliação de crescimento de raízes e raízes torcidas, entre outros. Índice mitótico, para a análise de taxa de divisão celular, aberrações cromossômicas, como: cromossomos em anel, pontes cromossômicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos, que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase e formação de micronúcleos, como indicadores de anormalidades no DNA, perfazem parâmetros microscópicos (CUCHIARA, 2012).

O IM e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*(BAGATINI, SILVA E TEDESCO, 2007). Segundo Figueiredo (2014) a citotoxicidade é basicamente medida pela taxa de crescimento celular, podendo estar aumentada ou diminuída e pode ser observada macroscopicamente. Para Lúcio Neto (2011), a redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações que podem ser derivadas da ação química do extrato sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto. Conforme Turkoglu (2008), a redução do IM pode ocorrer devido a uma inibição da síntese do DNA ou a um bloqueio da Fase G₂ do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose, indicando citotoxicidade daquela concentração.

Segundo Belcavello, 2012 o IM é calculado por meio da proporção entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas, servindo como parâmetros para análise de citotoxicidade, os efeitos aneugênicos foram avaliados por meio de células portadoras de alterações tais como: alterações na anáfase (anáfases

multipolares, pontes e atrasos), alterações na telófase (pontes e atrasos), células binucleadas e perdas cromossômicas.

Segundo Machado (2013), a mutagênicidade é o efeito tóxico que danifica, especificamente, o material genético presente na célula, acarretando uma mudança no DNA ou no próprio cromossomo e essa mutagênicidade, se tratando de uma substância química pode ser avaliada por diversos modos de ação, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a respiração celular; interferência da divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta, presença de anormalidades e micronúcleos nas células.

Os testes biológicos de mutagênicidade com plantas consistem em verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico das células, onde essas alterações podem ou não ser reparadas até o fim do ciclo celular. Foram observados pontes anafásicas para a concentração de 12,5 g/L, as alterações cromossômicas, mostradas nas figuras f, g e h, indicam que houve presença de aberrações cromossômicas (atrasos anafásicos), porém, essas alterações não foram significantes como mostra o gráfico 3, com ($P < 0,05$) e como podemos observar na tabela 1, podemos afirmar assim que a concentração de 12,5 g/L não possui efeito mutagênico. Os parâmetros mostrados na figura 7, demonstram que a concentração de 12,5 g/L, o número de frequências cromossômicas é aproximadamente igual ao número encontrado na solução para o controle negativo.

De acordo com Fão (2012), os efeitos mutagênicos e/ou genotóxicos podem ser observados por meio de algumas aberrações cromossômicas da formação de micronúcleos que são danos irreversíveis onde os MN são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com seqüência de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a divisão celular na mitose, onde um cromossomo inteiro ou fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo como podemos observar na figura i.

Segundo Lucio Neto (2011), a ocorrência dos micronúcleos está diretamente ligada a uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações

celulares causadas por defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese. Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, podendo os micronúcleos ser avaliados para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de teste com roedores e plantas (MENEGUETTI, 2011).

As presenças de micronúcleos foram satisfatórias apenas na concentração de 12,5 g/L e não foi significativa como podemos observar na figura 4. sendo um indicativo que essa concentração não possui ação aneugênica ou clastogênica quando comparada com o controle negativo ($P < 0,05$). E esses resultados são condizentes com a frequência de ACs indicando que nessa concentração os danos celulares resultantes das aberrações foram reparadas no decorrer do ciclo celular.

4 CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, conclui-se que as concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 g/L do extrato aquoso da raiz da *Turnera ulmifolia* L.apresentaram toxicidade e citotoxicidade, pelas células do teste *Allium cepa*. Onde na concentração utilizada pela população (50 g/L) apresentou grande toxicidade devido a sua inibição total no crescimento das raízes. Esse efeito pode ser atribuído pela sua capacidade de promover alterações em células eucarióticas devido sua forte correlação entre a composição química da planta analisada e o desenvolvimento de certas alterações celulares. Constatou-se que na concentração de 12,5 g/L não houve nenhuma divergência estatística quando comparadas ao controle negativo. Já na concentração de 25 g/L observou-se grande toxicidade devido a inibição do índice mitótico e crescimento das raízes, que foi estatisticamente diferente do controle negativo para ambos os parâmetros, podendo causar alelopatia celular e devido à grande inibição celular, não se pode observar alterações cromossômicas que seriam indicativos de cito e mutagenicidade. E as concentrações de 100 e 200 g/L foram totalmente tóxicas, sendo comprovada pela inibição total no crescimento das raízes.

Esses resultados permite inferir que o extrato aquoso da *Turnera Ulmifolia* L.utilizados em altas concentrações podem provocar danos irreversíveis ao material genético dos que dela fazem uso. Nessas condições, verifica-se que alguns estudos

Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica *daturnera ulmifolia* L. (chanana) em células eucarióticas complementares tornam-se viáveis, no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos geradores dos danos. No que diz respeito ao sistema de teste *Allium cepa*, observa-se que esse pode ser utilizado como um método regular para a triagem e análise de parâmetros relacionados à toxicidade, podendo prever um perfil inicial de segurança e eficácia de novas moléculas.

REFERENCIAS

AGRA, M. F. de; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p. 114-140, Jan./Mar. 2007.

ALVES, I. C. *et al.* **Potencial antioxidante do chá da folha da chanana *Turnera ulmifolia***. V Congresso de pesquisa e inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação e Tecnológica. Belém-PA.2009.

ARGENTA, S. C. Vivências: **Revista Eletrônica de Extensão da URI Vivências**. v.7, n.12, p.51-60, Maio. 2011

BAGATINI, D. M.; SILVA, A. C. F. da, TEDESCO S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bio indicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.17, n.3, p. 444-447 Jul./Set., 2007.

BELCAVELLO, L. *et al.* Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza online**, v.10, n.3, p. 140-145, 2012.

BOCHNER, R.; *et al.* Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira Pl. Medicina**, Botucatu, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BONASSI, S, A. *et al.* An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, **Carcinogenesis**. v. 28, p. 625–631; 2007.

CERVO, A. L.; BERVIAN, P.A.; SILVA, R. da. **Metodologia científica**. 6 ed. Pearson: São Paulo, 2007.

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

DIAS, M.G., *et al.* Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, p.202-208, 2014.



FÃO, F. Z. R. A., et al. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.91-98, jan./abr., 2012

FERREIRA, G. F.; et al. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogynenitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantiapallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.1A.p. 61-67, Jan./Mar. 2008.

FERREIRA, et al. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista eletrônica de Farmácia**. v.VI, n.1,p. 14 - 24, 2009.

FIGUEREDO, D. R. de. Avaliação da citotoxicidade do extrato hídrico da erva doce (*Pimpinella anisum L.*) através do teste em *Allium cepa L.* 2014.

FESKEJÓ, G. **The Allium test as standard in environmental monitoring**. Hereditas v.102, p.99-112, 1985.

IGANACI, J.R.V. Bobrowski, G. Heiden, V.C. Stein, B.H.G. Rocha. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa L.* **Arquivos Instituto Biologia**, São Paulo, v.73, n.1, p.79-82, jan./mar., 2006.

KOVALCHUK, O. et al, The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.415, p.47-57, 1998.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. de. **Metodologia Científica**. São Paulo: Atlas. 2011.

LIMA, E.O.; et al. *Turnera ulmifolia L. (Turneraceae): atividade antimicrobiana de seu óleo essencial*. 2007

LÚCIO NETO, M. P., Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. UFPI, Teresina, 2011.

MACHADO, A. T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (OSÓRIO-RS-BRASIL) através do sistema teste de *Allium cepa***. 2013. 32 P. Monografia (Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2013.

MALUF, S.W., ERDTMANN. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**. V.471,p.21-27, 2000.

MENEGUETTI, D. U. de O. Adaptação da técnica de micronúcleo em *allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**. V 10, N 2, p. 181-187, 2011.

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

SILVA, K. M. R. A., CATANHO, M. T. J. de A. **Avaliação do efeito antinoceptivo da *Turnera ulmifolia* L. Em camundongos.** XIX CONIC III CONITI VII JOIC CTG - UFPE – 2011

SILVA, F. C. da, et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.2, n.1.p.13-21, nov-abr, 2011.

PINHO, D. S. de, et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(2): 165-170, Abr./Mai. 2010.

TEIXEIRA, S.T.; MELO, J.I.M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. *Iheringia, Ser. Bot.*, v.61, n.1-2, 2006.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology** v.10, n.2, p.123-9, 2008.

