

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Flávia Pereira Campos

**PROSPECÇÃO DA COMPOSIÇÃO E CITOGENOTOXIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAS DE *Lippia* L.**

JUIZ DE FORA
2014

2014 PPGCBIO

Flávia Pereira Campos

ICB/UFJF

FLÁVIA PEREIRA CAMPOS

**PROSPECÇÃO DA COMPOSIÇÃO E CITOGENOTOXIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAS DE *Lippia* L.**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos.

**JUIZ DE FORA
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Flávia Pereira.

Prospecção da composição e citogenotoxicidade de óleos essenciais de LIPPIA L. / Flávia Pereira Campos. -- 2014. 55 f. : il.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Verbenaceae. 2. Óleos essenciais. 3. Efeitos citogenotóxicos. 4. Índice mitótico. 5. Alterações cromossômicas. I. Campos, José Marcello Salabert de, orient. II. Título.

FLÁVIA PEREIRA CAMPOS

**PROSPECÇÃO DA COMPOSIÇÃO E CITOGENOTOXIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAS DE *Lippia* L.**

Aprovado em 28 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dra. Luciana Moreira Chedier
Universidade Federal Juiz de Fora

Juiz de Fora
2014

*Ao meu marido e minha família...
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Senhor meu Deus e meu Pai, eu te agradeço por tudo o que tens feito em minha vida. Obrigada pela sua grandeza, pelo seu amor incondicional. Obrigada pelo carinho e por nunca desistir de mim, por me amparar em todos os momentos.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de pós-graduação em Genética e Biotecnologia pela oportunidade de fazer esse curso de mestrado.

Ao meu orientador, professor Doutor José Marcello Salabert de Campos, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela confiança depositada em meu trabalho e pelo direcionamento na condução dos experimentos.

À professora Doutora Luciana Moreira Chedier pela ajuda com a extração do óleo essencial e pela colaboração nas análises cromatográficas.

Ao professor Doutor Lyderson Facio Viccini por ter me cedido as plantas de *Lippia* para a realização deste projeto e por se mostrar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia pelas discussões científicas e pelos momentos de descontração. Em especial as amigas Camila e Shaiany pela amizade, disponibilidade, ensinamentos, incentivo e sugestões.

Agradeço ao Laboratório de Fitoquímica, em especial à Lorena pela ajuda na extração do óleo essencial.

Aos professores do Programa de pós-graduação pelo dinamismo, pelo conteúdo oferecido e pelo aprendizado.

Agradeço especialmente ao meu querido esposo Renato, minha grande e linda família, e àquela família que Deus me permitiu escolher: meus amigos, poucas palavras bastam.

À Fapemig, à Capes e ao CNPq pelos apoios financeiros para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a elaboração dessa dissertação e pela minha formação.

Muito obrigada!

“Na vida, o que aprendemos mesmo é a sempre fazer maiores perguntas.”

Guimarães Rosa

RESUMO

CAMPOS, F. P. Prospecção da composição e citogenotoxicidade de óleos essenciais de *Lippia* L. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

As plantas do gênero *Lippia* pertencem à família Verbenaceae e caracterizam-se por possuir diversas espécies com propriedades medicinais. Dentre os aspectos químicos e farmacológicos investigados em *Lippia*, destacam-se aqueles relacionados aos seus óleos essenciais. Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário, são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas. O objetivo deste estudo foi investigar efeitos citogenotóxicos de óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* (acesso BGEN 09) e *Lippia origanoides* (acessos or^o, or^s e or^v). *Allium cepa* (cebola) foi utilizado como modelo de avaliação de citogenotoxicidade. As raízes de cebola foram expostas por 24 horas em diferentes concentrações de óleo essencial (diluído em 2,5% de acetona) (50, 100, 200, 300 e 400µg/mL). Como controle negativo foi utilizado água destilada e acetona 2,5%. E como controle positivo o Metil Metano Sulfonato (4×10^{-4} M). Para ao preparo das lâminas a técnica utilizada foi o esmagamento. Parâmetros de ciclo celular e indução de alterações cromossômicas foram avaliados. Os óleos obtidos foram analisados por Cromatografia com fase gasosa acoplada com espectrometria de Massa (CG-EM). Os constituintes majoritários dos óleos essenciais foram: citral, trans-hidrato sabineno, 1,8-cineol e carvacrol para *Lippia alba*, *L. origanoides*, acessos or^o, or^s e or^v respectivamente. De um modo geral, todos os óleos investigados interferiram na dinâmica normal do ciclo celular (interferência sobre índices mitóticos ou índices de fases). Estes efeitos foram mais evidentes para o óleo extraído de *L. alba*. Do mesmo modo, a exposição aos óleos essenciais evidenciou o aumento nos percentuais de algumas alterações cromossômicas, como cromossomos aderentes, perda de cromossomos, pontes cromossômicas e segregação tardia. Dentre os resultados observados, o envolvimento de alterações aneugênicas parece ser o efeito mais evidente. Possíveis relações entre as substâncias encontrados nos óleos destas espécies com as alterações observadas são discutidas. Este estudo sugere, portanto, o uso racional de plantas da espécie de *Lippia* para fins terapêuticos e mostra a necessidade de mais estudos sobre seu potencial citogenotóxico.

Palavras-chave: *Lippia*, óleo essencial, citogenotoxicidade, *Allium cepa*

ABSTRACT

CAMPOS, F. P. Prospecting and cytogenotoxicidade composition of essential oils from *Lippia* L. species. Dissertation (Master in Biological Sciences) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

Many species of the genus *Lippia* (Verbenaceae family) characterized by their medicinal properties. Among the chemical and pharmacological aspects investigated in *Lippia*, those related to its essential oils stand out. Essential oils are produced by secondary metabolism and are complex mixtures of volatile and lipophilic substances. The aim of this study was to investigate the cytogenotoxic effects of essential oils from *Lippia alba* (BGEN 09 acess) and *Lippia organoides* (or^o, or^s and or^v access). *Allium cepa* (onion) was used as a model for cytogenotoxicity evaluating. The onion roots were exposed for 24 hours at different concentrations of essential oil (diluted in 2.5% acetone) (50, 100, 200 , 300 and 400µg/mL). As a negative control was used distilled water and 2.5% acetone. And as the positive control Methyl methane sulfonate ($4 \times 10^{-4}M$). The slides were prepared by squashing. Parameters of cell cycle and induction of chromosomal alterations were evaluated. The oils were analyzed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC -MS). The major constituents of the essential oils were citral, trans - sabinene hydrate , 1,8-cineole and carvacrol for *Lippia alba* , *L. organoides* (or^o, or^s and or^v accesses) respectively. In general , all oils investigated interfered in the normal dynamics of the cell cycle (interference on mitotic index or phases indices). These effects were most evident for the oil extracted from *L. alba*. Similarly, exposure to the essential oils showed some increase in the percentage of chromosomal alterations, as adherent chromosomes, loss of chromosomes, later segregation and bridges. Among the observed results, the involvement of aneupenic changes seems to be the most obvious effect. Possible relationships between the compounds found in oils of these species with the changes observed are discussed. This study therefore suggests the rational use of plants of the species *Lippia* for therapeutic purposes and shows the need for more studies on its cytogenotoxic potential.

Keywords: *Lippia*, essential oil, cytogenotoxicity, *Allium cepa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Lippia alba</i>	15
Figura 2.	<i>Lippia sidoides</i> e <i>Lippia origanoides</i>	17
Figura 3.	Comparação entre as cinco substâncias majoritários de cada um dos acessos de <i>Lippia origanoides</i> .	29
Figura 4.	Análise do ciclo celular após exposição ao óleo essencial de espécies de <i>Lippia</i>	30
Figura 5.	Segregação normal dos cromossomos em uma anáfase típica e Segregação tardia de cromossomos em anáfase.	32
Figura 6.	Perda cromossômica em anáfase/telófase.	36
Figura 7.	Ponte cromossômica em anáfase	36
Figura 8.	Aderência cromossômica	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .	26
Tabela 2	Composição dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> , acessos or ^o , or ^s e or ^v	27
Tabela 3	Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> às diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .	33
Tabela 4	Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> às diferentes concentrações de óleo essencial do acesso or ^o de <i>Lippia origanoides</i> .	33
Tabela 5	Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> às diferentes concentrações de óleo essencial do acesso or ^s de <i>Lippia origanoides</i> .	34
Tabela 6	Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> a concentrações de óleo essencial do acesso or ^v de <i>Lippia origanoides</i> .	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

L.	<i>Lippia</i>
CG-MS	Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
µL	Micrograma
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
T5	Tratamento 5
dH ₂ O	Água destilada
MMS	Metil Metano Sulfonato
DIC	Delineamento Inteiramente ao Acaso
mL	Mililitro
HCl	Ácido Clorídrico
IM	Índice Mitótico
NCD	Número de Células em Divisão
NTC	Número Total de Células Analisada
IFs	Índices de Fases
IPr	Índice Profásico
IMe	Índice Metafásico
IAn	Índice Anáfase
ITe	Índice Telofásico
NCP	Número de Células em Prófase
NCM	Número de Células em Metáfase
NCA	Número de Células em Anáfase
NCT	Número de Células em Telófase
ACC	<i>Alterações Cromossômicas e Celulares</i>
α	Alfa
Or ^o	<i>Lippia organoides</i> original
Or ^s	<i>Lippia sidoides</i>
Or ^v	<i>Lippia velutina</i>

β	Beta
M	Molar
CN1	Controle negativo
IR	Índice de retenção
TR	Tempo de retenção
CN2	Controle positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O GÊNERO <i>Lippia</i> L.	14
1.2 ATIVIDADES CITOGENOTÓXICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E OS ENSAIOS EM PLANTAS	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	22
3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL	22
3.3 ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE	23
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Lippia* L.

Lippia Linn. é um dos principais gêneros da família Verbenaceae, com aproximadamente 200 espécies ocorrendo nos neotrópicos e na África (SALIMENA, 2000; SALIMENA et al., 2013). O gênero está inserido na tribo *Lantaneae* Endler, a maior entre as oito tribos pertencentes à família Verbenaceae, segundo a classificação mais recente da família (MARX et al., 2010; O`LEARY et al., 2012). Os principais centros de diversidade das espécies de *Lippia* estão localizados no Brasil, Argentina e México (SALIMENA, 2000; SALIMENA et al., 2013).

Lippia caracteriza-se por possuir diversas espécies com propriedades medicinais. Popularmente, o uso mais comum de *Lippia* é para o tratamento de distúrbios respiratórios tais como resfriados, gripes, bronquites, tosse e asma. (SALIMENA 2000) Entretanto, Pascual et al. (2001) em uma revisão apresentam diversos outros usos populares de espécies do gênero.

O gênero se destaca por sua riqueza química e farmacológica justificando o fato de que a maioria dos estudos realizados tenha este foco. Diversas ações são conhecidas para espécies do gênero, tais como: atividade antimicrobiana (OWOLABI et al., 2009; SHIKANGA et al., 2010); atividade antiinflamatória e propriedade antifúngica (FUNARI et al., 2012); atividades anti-helmíntica (VASCONCELOS, 2006), efeitos antisséptico e cicatrizante (COSTA et al., 1998), propriedades antioxidante (AVILA-SOSA et al., 2010; QUIROGA et al., 2013) e antinoceptiva (MARÇAL et al., 2006), atividade antimalárica (VALENTIN et al., 1995), larvicida (GOMES et al., 2012) e também ação contra protozoários (ESCOBAR et al., 2010).

Dentre os aspectos químicos e farmacológicos investigados para o gênero *Lippia*, destacam-se aqueles relacionados aos seus óleos essenciais. Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e afins. São misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua

maioria, por moléculas de natureza terpênic (MORAIS, 2009) e de outras propriedades químicas (GOMES et al., 2011). Diversas espécies de *Lippia* já tiveram a constituição do seu óleo essencial investigada, entre as principais estão *L. alba*, *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. gracilis*, *L. origanoides* e *L. sidoides*^(*) (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). Em geral, geranial, carvona, carvacrol e timol são os constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia* (ESCOBAR et al., 2010; MENDES et al., 2010; JANNUZZI et al., 2011; GOMES et al., 2012; HATANO et al., 2012; FERRAZ et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Lippia*, *L. alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson (Figura 1) se destaca por apresentar características importantes do ponto de vista econômico. Trata-se de uma espécie amplamente distribuída nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos, México e Índias Ocidentais até a Argentina e Uruguai. A espécie ocorre em praticamente todos os tipos de ambientes, desde florestas, brejos, campos e até em beira de estradas, sendo muito cultivada para uso medicinal (SALIMENA, 2000). Apesar de amplamente distribuída pelo continente americano, o Brasil é o país que concentra o maior número de registros da espécie, com ampla distribuição ao longo do território.



Figura 1 - *Lippia alba* (planta mantida na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG). Foto do autor.

* Esta espécie é agora classificada como sinônimo de *Lippia origanoides* (O'Leary et al., 2012)

L. alba é conhecida por vários nomes populares, como, erva cidreira, falsa melissa, chá de tabuleiro, erva cidreira do campo, salva do Brasil, salva-limão e erva cidreira brava. Diferentes atividades farmacológicas têm sido atribuídas aos componentes presentes no óleo essencial extraído da espécie tais como atividade ansiolítica, analgésica, anestésica, antitérmica, bactericida, fungicida, anticonvulsivante, antiinflamatória, antiespasmódica, antígenotóxica e sedativa (PASCUAL et al., 2001; SHUKLA et al., 2009; LÓPEZ et al., 2011; HATANO et al., 2012; BLANCO et al., 2013).

Para *L. alba* encontram-se diversos trabalhos na literatura que estudam aspectos relacionados ao seu óleo essencial. Geranial, carvona e linalol são as substâncias geralmente encontradas como majoritárias (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). Entretanto a composição do óleo essencial é extremamente variável, sugerindo a existência de vários quimiotipos (HENNEBELLE et al., 2008). Além dos fatores ambientais que influenciam a produção e composição do óleo essencial, Yamamoto (2006) demonstrou que dentro da espécie existe variabilidade genética em relação à composição química do óleo.

Estes autores propõem uma classificação para os quimiotipos como a seguir: quimiotipo 1 apresentando citral, linalol e β -cariofileno como os principais constituintes, o quimiotipo II com tagetenona, o III com limoneno e uma quantidade variável de carvona, o IV com mirceno, o V com γ -terpineno, o VI com cânfora e 1,8-cineol, e o VII com estragole.

Dentre as espécies aqui investigadas, *L. sidoides* e *L. origanoides* (Figura 2) também se destacam. Estas espécies são hoje classificadas como sinonímias e chamadas de *L. origanoides* segundo revisão da seção *Goniostachyum* ao qual elas pertencem (O'LEARY et al., 2012). Segundo estes autores, *L. origanoides* é uma espécie variável, com ampla distribuição, desde a Guiana até o Norte da Argentina na América do Sul e também encontrada na Meso-América onde comumente é chamada de *Lippia graveolens*, também considerada como sinonímia de *L. origanoides* por O'Leary et al. (2012). Diversas atividades têm sido descritas para estas espécies, como antifúngica (FARIAS et al., 2012); antibiótica (VERAS et al., 2012); anti-inflamatória, gastroprotetiva e antioxidante (MONTEIRO et al., 2007); anti-leishmanicida e citotóxica (MEDEIROS et al., 2011) entre outras.

Diversos trabalhos avaliaram a composição do óleo essencial destas duas espécies quando ainda tratadas como espécies distintas. Na quase totalidade destes

trabalhos, timol e carvacrol foram os componentes majoritários encontrados no óleo de ambas as espécies, reforçando suas similaridades e possível sinonímia. (JESUS et al., 2006; FONTENELLE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2010; ESCOBAR et al., 2010; FARIAS-JÚNIOR et al., 2012; GOMES et al., 2012; MOTA et al., 2012; MORAIS et al., 2012; RONDON et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; VERAS et al., 2013).



Figura 2 - *Lippia sidoides* (à esquerda) e *Lippia origanoides* (plantas mantidas na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG). Ambas foram sinonimizadas como *L. origanoides*. Foto do autor.

1.2 Atividades citogenotóxicas de óleos essenciais e os ensaios em plantas

Entre as possíveis atividades biológicas relacionadas aos óleos essenciais estão aquelas relacionadas a cito e genotoxicidade. Diversos trabalhos têm demonstrado estes tipos de atividades relacionados aos óleos essenciais ou aos constituintes dos mesmos (HWANG e KIN, 2012; DI SOTTO et al., 2013; DUA et al., 2013; KEKEC et al., 2013; LIJU et al., 2013; MADEMTZOGLOU et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). Devido ao grande número de constituintes, os óleos

essenciais não parecem possuir alvos celulares específicos (CARSON et al., 2002; BAKKALI et al., 2008). Os seus efeitos citotóxicos geralmente estão associados às suas propriedades lipofílicas que causam danos à estrutura de paredes e membranas celulares (BAKKALI et al., 2008). Outros trabalhos descrevem a coagulação do citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998), danos a lipídeos e proteínas (BURT, 2004), quebra de macromoléculas e lise celular (OUSSALAH et al., 2006), despolimerização da membrana mitocondrial (VERCESI et al., 1997). Do mesmo modo, encontram-se na literatura trabalhos demonstrando efeitos genotóxicos de óleos essenciais em diversos tipos celulares. Mademtozoglou et al. (2013) demonstraram o efeito genotóxico do γ -terpineno e do terpinoleno no *Wing Spot Test* em *Drosophila*. Já Süleyman et al. (2012) encontraram um aumento na frequência de aberrações cromossômicas, micronúcleo, células apoptóticas, necróticas e binucleadas após exposição de linfócitos humanos em cultura ao óleo essencial de *Urtica dioica*.

Uma das possibilidades para avaliação de efeitos citogenotóxicos dos óleos essenciais está nas aplicações de ensaios utilizando células vegetais. Bozari et al. (2014) analisaram o efeito citogenotóxico do óleo essencial de *Nepeta nuda* em células meristemáticas de *Zea mays*. Inibição do crescimento das raízes e parte aérea foi observada em uma resposta dependente da concentração. Os autores demonstraram ainda genotoxicidade do óleo utilizando RAPD como ferramenta de análise. Do mesmo modo, Silva et al. (2011) analisaram o efeito do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus* (*H. psiadioides* e *H. alienus*). Estes autores utilizaram células meristemáticas de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* como modelo de avaliação de citogenotoxicidade. De um modo geral, reduções nos índices mitóticos e aumento nos percentuais de alterações cromossômicas foram observados após exposição aos óleos. O mesmo efeito foi observado em outros trabalhos, como para o óleo de *Schinus lentiscifolius* avaliado em *Lactuca sativa* e *Allium cepa* (PAWLOWSKI et al., 2012).

Os ensaios de citogenotoxicidade utilizando modelos vegetais têm sido rotineiramente empregados para avaliação de efeitos tóxicos/mutagênicos de extratos biológicos/soluções/poluentes ambientais (KURAS et al., 2006; CARITÁ e MORALES, 2008; OLIVEIRA-MARTINS e GRISOLIA, 2009; HOSHINA e MORALES, 2009; DONG e ZHANG, 2010). Vários modelos estão disponíveis, entre eles *Allium cepa* (LEME e MORALES, 2009), *Hordeum vulgare* (DONG e ZHANG, 2010), *Vicia*

faba (DONG e ZHANG, 2010), *Crepis capilaris* (GADEVA e DIMITROV, 2008), *Zea mays* (GRANT e OWENS, 2006) e *Lactuca sativa* (SOUSA et al., 2009). Entre estes, *Allium cepa* é o modelo mais utilizado, sendo considerado um teste padrão para avaliação de citogenotoxicidade (FISKESJÖ, 1985).

O uso de modelos vegetais permite o acesso a vários parâmetros genéticos que variam desde mutações pontuais até alterações cromossômicas em células de diferentes tecidos e órgãos, tais como folhas, raízes e grãos de pólen (GRANT, 1994; LEME e MORALES, 2009). Entre os aspectos positivos do uso de plantas superiores como modelos de avaliação de citogenotoxicidade se encontram: a) Métodos de exposição são rápidos e de baixo custo; b) Permitem a detecção em alguns casos de mutações pontuais; c) Cromossomos “grandes” e em baixo número o que permite facilmente a detecção de alterações cromossômicas; d) Boa correlação dos dados obtidos em plantas com modelos animais (GRANT, 1994).

Várias estratégias têm sido utilizadas em plantas para a detecção de citogenotoxicidade. Entre as mais comuns está a análise de parâmetros citogenéticos, tais como, índice mitótico e percentuais de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais (YILDIZ et al., 2009; KURAS et al., 2009; TEERARAK et al., 2009; SOUSA et al., 2009). De um modo geral, os percentuais de células em divisão (índice mitótico) e as alterações cromossômicas são calculados como uma resposta às dosagens ou tratamentos diferenciados. O decréscimo ou aumento dos percentuais de células em divisão podem ser considerados parâmetros seguros para determinar a presença de agentes citotóxicos (SMALA-KINCL et al., 1996).

Já a análise de alterações cromossômicas em todas as fases da divisão celular, como proposto inicialmente por Fiskesjö (1985), torna a avaliação dos efeitos mais compreensiva, uma vez que promove uma melhor investigação dos mecanismos de ação dos agentes testes. Várias alterações podem ser detectadas, entre elas: pontes e fragmentos em anáfase, segregação desigual ou tardia de cromossomos, ascensão precoce de cromossomos, perda de cromossomos, anáfase/telófase multipolar, c-metáfases e cromossomos aderentes. De um modo geral, alterações como pontes e fragmentos são indicativos de efeitos clastogênicos enquanto que perda de cromossomos, segregação tardia, ascensão precoce, multipolaridade e c-metáfases são indicativos de efeitos aneugênicos (LEME e MORALES, 2009). Adicionalmente ao uso desses parâmetros, Ma et al. (1995)

descreveram a avaliação de micronúcleos em células meristemáticas F1 como um dos indicadores mais simples de citogenotoxicidade.

Para espécies de *Lippia*, pouco se conhece sobre propriedades citogenotóxicas de seus óleos essenciais ou de outros produtos naturais. Em um dos poucos trabalhos, Sousa et al. (2009) avaliaram o potencial citogenotóxico do extrato aquoso de *L. alba* utilizando alface (*Lactuca sativa*) como modelo. Inibições de germinação e crescimento radicular e interferência sobre o ciclo celular foram observadas. O extrato de *L. alba* em concentrações de 20 e 30 g/L inibiram em 9 e 61%, respectivamente, o índice mitótico em comparação com os tratamentos controle. Outros trabalhos têm demonstrado atividades antígenotóxicas de óleos essenciais de *Lippia*: Vicuña et al. (2010) analisaram a atividade antígenotóxica contra bleomicina do óleo essencial de *L. origanoides* utilizando o Cromoteste SOS em *Escherichia coli*, obtendo resultados positivos. O mesmo ensaio foi utilizado para se testar o óleo de *L. alba* e os resultados também foram positivos (LÓPEZ et al., 2011).

Sendo assim, fica evidente a necessidade de mais trabalhos que tenham como objetivo avaliar o efeito citogenotóxico de extratos aquosos, peptídicos, óleo essencial ou componentes químicos de espécies de *Lippia*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito citogenotóxico de óleos essenciais de espécies de *Lippia alba* e *Lippia organoides* (*Lippia organoides original*, *Lippia velutina* e *Lippia sidoides*) caracterizados quimicamente visando avaliar seus efeitos citogenotóxicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e analisar a composição química do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia alba* e de três acessos de *Lippia organoides* em CG/EM
- Avaliar o efeito citogenotóxico dos óleos essenciais destas espécies utilizando *Allium cepa* como modelo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora dispõe na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas no campus da UFJF (coordenadas: 23°35'45''S 46°43'65''W), diversas espécies de *Lippia* e diferentes acessos de algumas destas espécies. Duas espécies foram investigadas no presente estudo: *L. alba* e *L. origanoides*. Para *L. alba* foi utilizado o acesso BGEN 09 e para *L. origanoides* foram utilizados três materiais: um deles era originalmente classificado no Banco de Germoplasma como *L. origanoides*, outro como *L. sidoides* e o terceiro como *L. velutina*. Uma vez que o trabalho apresentado por O`Leary et al. (2012) propõe a sinonimização destas espécies em *L. origanoides*, elas foram tratadas neste estudo como *L. origanoides*, acessos or^o , or^s e or^v (respectivamente para *L. origanoides* original, *L. sidoides* e *L. velutina*). Estas espécies estão depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF.

3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada em um aparelho de Clevenger modificado, através do método de hidrodestilação durante três horas no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG. As folhas (aproximadamente 100g) coletadas de cada espécie e acessos foram colocadas em um balão de fundo redondo onde foi acrescentada água destilada.

Após 2 horas de extração, o óleo foi recolhido e armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechados com tampas de borracha, cobertas com folha de alumínio, e mantidos sob-refrigeração à temperatura de -20°C, para serem submetidos às análises subseqüentes.

As análises dos óleos foram realizadas por Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). As amostras foram analisadas na

Plataforma Analítica da Farmanguinhos (FIOCRUZ-Rio de Janeiro-RJ, Brasil), usando um Cromatógrafo de Gás Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 30mX0,25mm, 0,25µm de espessura de fase), gás hélio com um fluxo de 1,0 mL/min; com programa de temperatura de 70°C a 290°C (2°C/min), acoplado com um Espectrômetro de Massas Hewlett-Packard 5972. Os parâmetros de operação do MS foram: 70eV, fonte de íons 250°C equipado com EI.

A identificação dos constituintes foi efetuada pela comparação dos seus Índices de Retenção (IR) com os valores de literatura e os dados de EM com aqueles do banco de dados de espectro de massa Wiley 275,1 disponíveis na literatura.

$$IR = 100x \left(n + \frac{t_s - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

Onde: IR – índice de retenção;

n – número de carbonos do hidrocarboneto anterior;

t_s – tempo de retenção da substância analisada;

t_n – tempo de retenção do hidrocarboneto anterior;

t_{n+1} – tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

3.3 ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE

Os ensaios de citogenotoxicidade foram realizados em modelo vegetal, utilizando-se sementes de *Allium cepa* (2n=16), da variedade Baia Periforme (Feltrin® Lote 0003801210000140). Foram testadas cinco concentrações de óleo essencial obtidas a partir da diluição deste em acetona 2,5% (T1 = 50µg/mL; T2 = 100 µg/mL; T3 = 200 µg/mL; T4 = 300µg/mL e T5 = 400µg/mL). Como controle negativo foram testadas a água destilada (dH₂O) e a acetona 2,5%, e como controle positivo o Metil Metano Sulfonato (MMS 4x10⁻⁴M).

Os tratamentos foram dispostos em Delineamento Inteiramente ao Acaso (DIC) composto de 3 repetições obtidas a partir da média da análise de 3 meristemas radiculares. As sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação em placas de Petri (9 cm de diâmetro), forradas com papel filtro e

umedecidas com água destilada (0,8mL). Quando as raízes atingiram aproximadamente 1,0cm de comprimento as mesmas foram submetidas aos tratamentos em uma nova placa de Petri (de 6cm de diâmetro) umedecida com 0,8mL das soluções testes investigadas (óleos e controles) por 24h de exposição. Durante todo o período de germinação e exposição, as sementes foram mantidas em condições controladas (sala de crescimento de plantas com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro) e intensidade luminosa de $40 \mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas).

Após exposição, as raízes foram coletadas, lavadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético). Após 24h, a solução fixadora foi renovada e as raízes mantidas a 4°C . Para o preparo das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento, de acordo com Leme e Morales (2009), com adaptações. As raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas novamente em água destilada. Em uma lâmina, a região meristemática foi cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi e a mesma foi mantida imersa em uma gota de ácido acético 45%. O meristema foi cuidadosamente esmagado entre lâmina e lamínula e esta última posteriormente retirada com o auxílio de nitrogênio líquido. As células foram coradas com Giemsa 5% durante quatro minutos, procedendo-se posteriormente à análise das mesmas. Foram analisados os seguintes parâmetros:

A) Índice mitótico (IM%) (percentual de células em divisão)

Para se calcular o índice mitótico foi utilizada a equação:

$$\text{IM} = \text{NCD}/\text{NTC} \times 100$$

sendo NCD o número de células em divisão e NTC o número total de células analisadas. Foram analisadas, no mínimo 1000 células por lâmina (ALVIM et al., 2011).

B) Índices de fases (IFs%) (percentuais de células em cada uma das fases da mitose)

Os índices de fases (IFs), Profásico-IPr; Metafásico-IMe; Anafásico-IAn e Telofásico-ITe, foram calculados utilizando as equações:

$$IPr = NCP/NTCD$$

$$IMe = NCM/NTCD$$

$$IAn = NCA/NTCD$$

$$ITe = NCT/NTCD$$

sendo NCP, NCM, NCA e NCT o número de células em Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase, respectivamente e NTCD o número total de células em divisão analisado.

C) Percentuais de alterações cromossômicas e celulares (ACC%)

Os seguintes percentuais de alterações cromossômicas foram obtidos: alinhamento tardio, c-metáfase, cromossomos aderentes, perdas cromossômicas, fragmentos cromossômicos, segregação tardia, ponte cromossômica, multipolaridade, brotos e micronúcleos.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de Dunnett, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises dos óleos essenciais das espécies investigadas são mostrados nas Tabelas 1 e 2. *Lippia alba* é rica principalmente em mono e sesquiterpenos (Tabela 1). O constituinte majoritário foi o citral (geranial – 10,68% e neral – 8,30%) (Tabela 1). Embora seja conhecida como uma espécie com vários quimiotipos, muitos trabalhos já demonstraram o geranial e o neral como os compostos majoritários (JESUS et. al., 2006; OLIVEIRA et. al., 2006; SILVA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010. JANNUZZI et al., 2011). Segundo Hennebelle et al. (2008) este pode ser classificado como quimiotipo 1. Os acessos de *L. organoides* investigados são ricos em mono e sesquiterpenos (Tabela 2).

Tabela 1 – Composição do óleo essencial de *Lippia alba*, acesso BGEN 09.

Constituintes	TR	IRcal	IRlit*	Área (%)	Classe química
α -pineno	7,966	941	939	1,27	Monoterpeno
1-octen-3-ol	9,139	986	978	4,81	Hidrocarboneto
6-metil-5-hepten-2-ona	9,258	990	985	1,06	Hidrocarboneto
3-octanol	9,592	1002	993	1,03	Hidrocarboneto
<i>p</i> -cimeno	10,475	1033	1026	3,22	Monoterpeno
1,8 cineol	10,720	1042	1033	0,49	Monoterpeno
<i>cis</i> -Óxido de linalol	11,796	1079	1074	1,47	Monoterpeno
<i>trans</i> -Óxido de linalol	12,256	1095	1088	0,59	Monoterpeno
Linalol	12,583	1106	1098	1,07	Monoterpeno
Aldeído de α -canfoleno	13,474	1137	1108	0,55	Monoterpeno
ND	16,301	1236		1,53	Monoterpeno
Neral	16,672	1249	1240	8,30	Monoterpeno
Geranial	17,504	1279	1270	10,68	Monoterpeno
ND	17,860	1292		3,08	
epóxi-Óxido de linalol	18,001	1297	1198	2,23	Monoterpeno
ND	18,773	1326	1291	1,09	
Myrtenylacetate	19,010	1334	1235	4,35	Monoterpeno
Carvotanacetone	19,337	1347	1246	3,58	
Ácido gerânico	20,154	1377	1355	9,32	Monoterpeno
α -Copaeno	20,317	1383	1376	5,64	Monoterpeno
Trans-carveol	20,651	1396	1217	1,37	Monoterpeno
Nepetalactona	20,163	1416	1306	1,32	Monoterpeno
Alo-aromadendreno	22,707	1477	1461	3,21	Sesquiterpeno
Delta-cadinene	24,058	1532	1524	0,76	Sesquiterpeno
ND	24,369	1545		2,40	
Óxido de cariofileno	25,765	1603	1581	9,07	Sesquiterpeno
Adamantano	26,396	1631	1623	1,16	Hidrocarboneto
α -eudesmol	27,368	1674	1652	1,07	Sesquiterpeno
Caryofilan-3,8(13)-dien-5- β -ol	30,916	1838		1,11	Sesquiterpeno
Abietol	37,017	2156		1,27	
Total				88,1	

ND – Não determinado. Os cinco constituintes majoritários estão em negrito.

Tabela 2 – Composição dos óleos essenciais de *Lippia origanoides*, acessos *or^o*, *or^s* e *or^v*.

<i>L. origanoides</i>		Acesso <i>or^o</i>			Acesso <i>or^s</i>			Acesso <i>or^v</i>			Classe química
Constituintes	TR	Ircal	IRlit*	Área (%)	Ircal	IRlit*	Área (%)	Ircal	IRlit*	Área (%)	
α -Tujeno	7,108	933	931	1,30	909	931	0,41	908	931	1,74	Monoterpeno
α -Pirreno	7,353	941	939	0,55	918	939	9,90	917	939	0,36	Monoterpeno
Sabineno	8,341	981	976	2,16	955	976	4,25	955	976	0,12	Monoterpeno
β -Pirreno	8,497	988	980	0,37	961	980	1,54	-	-	-	Monoterpeno
Mirceno	8,705	996	991	4,65	969	991	2,46	969	991	2,78	Monoterpeno
α -Felandreno	9,267	-	-	-	991	1005	7,55	989	1005	0,33	Monoterpeno
α -Terpineno	9,522	1026	1018	2,96	1000	1018	0,17	1000	1018	1,83	Monoterpeno
<i>o</i> -Cimeno	9,768	-	-	-	1009	1010	2,46	1009	1010	14,43	Monoterpeno
<i>p</i> -Cimeno	9,781	1034	1026	4,00	-	-	-	-	-	-	Monoterpeno
Limoneno	9,931	1039	1031	2,19	1014	1031	7,59	-	-	-	Monoterpeno
1,8-Cineol	10,065	1034	1033	5,92	1019	1033	11,18	-	-	-	Monoterpeno
γ -Terpinol	10,674	1068	1062	7,04	1040	1062	0,39	1041	1062	8,46	Monoterpeno
<i>Trans</i> -hidrato de sabineno	11,045	1083	1069	10,62	1053	1069	0,52	-	-	-	Monoterpeno
α -Terpinoleno	11,454	1095	1088	2,96	1067	1088	0,25	1067	1088	0,05	Monoterpeno
Linalol	11,818	1109	1098	4,33	1080	1098	0,18	1081	1098	2,94	Monoterpeno
<i>Cis</i> -hidrato de sabineno	11,937	1114	1068	4,05	1080	1068	0,26	-	-	-	Monoterpeno
4-Terpineol	14,240	1196	1177	10,54	1164	1177	0,63	1164	1177	1,29	Monoterpeno
L-borneol	14,515	1186	1165	1,48	-	-	-	-	-	-	Monoterpeno
α -Terpineol	14,678	1207	1189	1,62	1179	1189	3,21	-	-	-	Monoterpeno
1- <i>s</i> -Verbenona	15,094	-	-	-	1193	1191	3,72	-	-	-	Monoterpeno
Metil éter de timol	15,562	-	-	-	-	-	-	1210	1211	8,65	Monoterpeno
Timol	17,255	1299	1290	6,40	-	-	-	1270	1290	5,39	Monoterpeno
Carvacrol	17,694	-	-	-	-	-	-	1286	1298	41,56	Monoterpeno
α -Copaeno	19,588	-	-	-	1356	1376	1,58	-	-	-	Monoterpeno
β -Cariofileno	20,806	1437	1418	2,63	1402	1418	6,35	1400	1418	1,99	Sesquiterpeno
9- <i>epi</i> (<i>E</i>)-Cariofileno	22,307				-	-	-	1461	1467	2,45	Sesquiterpeno
α -Humuleno	22,311	1473	1454	1,54	-	-	-	-	-	-	Sesquiterpeno
<i>D</i> -Germacreno	22,314	1497	1480	1,31	1461	1480	2,85	-	-	-	Sesquiterpeno
γ -Gurjuneno	22,508	-	-	-	1469	1473	2,53	-	-	-	Sesquiterpeno
β -Chamigreno	22,664	-	-	-	1475	1475	2,37	-	-	-	Sesquiterpeno
Biciclogermacreno	22,676	1512	1494	1,22	-	-	-	-	-	-	Sesquiterpeno
δ -Cadineno	23,154	1532	1524	0,49	1495	1524	2,09	1494	1524	0,32	Sesquiterpeno
Elemol	23,890	1564	1549	1,81	-	-	-	-	-	-	Sesquiterpeno
Óxido de cariofileno	24,810	1602	1581	0,94	1563	1581	2,94	-	-	-	Sesquiterpeno
Guaiol	25,078	1613	1595	1,62	1575	1595	2,52	-	-	-	Sesquiterpeno
Adamantano	26,058	1630	1623	0,30	1616	1623	1,4	-	-	-	Hidrocarboneto
α -Eudesmol	27,084	1676	1652	1,55	-	-	-	-	-	-	Sesquiterpeno
Tujopsanona	26,519				1650	1473	3,57	-	-	-	Sesquiterpeno
Tetracosano	40,777	2405	2400	2,24	-	-	-	-	-	-	Hidrocarboneto
Total				87,25			84,24			94,69	

or^o – *Lippia origanoides* original, *or^s* – *Lippia sidoides* (antiga classificação), *or^v* – *Lippia velutina* (antiga classificação). As três espécies são classificadas agora como sinônimas e chamadas de *L. origanoides* (O'Leary et al., 2012).

De um modo geral, podemos afirmar que os óleos dos três acessos investigados são similares qualitativamente uma vez que aproximadamente 62% dos constituintes encontrados nestes óleos estavam presentes em pelo menos 2 dos óleos investigados e 28% nos 3 óleos (Tabela 2). Entretanto quando se analisa somente os constituintes majoritários, diferenças são observadas: no óleo do acesso or^o (espécie originalmente classificada como *L. origanoides* no Banco de Germoplasma de *Lippia* da UFJF) o majoritário foi o trans-hidrato sabineno com 10,62%, no acesso or^s (classificada anteriormente como *L. sidoides*) foi o 1,8-cineol com 11,18% e o no acesso or^v (*L. velutina* na classificação antiga) foi o carvacrol com 41,56% (Tabela 2, Figura 3).

Foram testados 5 constituintes majoritários dos 3 acessos investigados, tem-se 12 substâncias diferentes, uma vez que 3 deles se repetem em dois acessos como majoritários, sendo estes 3 o 1,8-cineol (majoritário nos acessos or^o e or^s), γ -Terpinenol (nos acessos or^o e or^v) e o timol (nos acessos or^o e or^v) (Figura 3). Nenhuma das substâncias aparecem entre os 5 constituintes majoritários em todos os 3 acessos investigados (Figura 3). Portanto, 9 constituintes tidos como majoritários em um dos acessos estudados não configuram entre os 5 majoritários nos outros dois acessos (Figura 3). Neste sentido, destaque pode ser dado ao carvacrol que embora se apresente como o constituinte majoritário no acesso or^v (41,56%) não se demonstrou presente nos óleos dos dois outros acessos (or^o e or^s) (Tabela 2, Figura 3).

Considerando os diversos trabalhos descritos na literatura que analisaram *L. origanoides*, *L. sidoides* e *L. velutina*, os resultados são variáveis. Carvacrol e timol são os constituintes na maioria das vezes encontrados como majoritários para estas espécies (O'LEARY et al., 2012). O carvacrol encontrado no presente como o composto majoritário do acesso or^v (41,56%) já havia sido relatado como composto majoritário em diversos trabalhos que estudaram materiais de *Lippia* classificados ora como *L. origanoides* (ESCOBAR et. al., 2010; OLIVEIRA et. al., 2007), ora como *L. sidoides* (FARIAS-JÚNIOR et. al., 2012; CAVALCANTI et. al., 2010). Já o timol, é relatado em alguns trabalhos como o majoritário de *L. origanoides* e *L. sidoides* (JESUS et. al., 2006; CAMURÇA-VASCONCELOS et. al., 2007; FONTENELLE et. al., 2007; OLIVEIRA et. al., 2009; CAVALCANTI et. al., 2010; ESCOBAR et. al., 2010; FARIAS-JÚNIOR et. al., 2012; GOMES et. al., 2012; MOTA et. al., 2012;

RONDON et. al., 2012; CARVALHO et. al., 2013; VERAS et. al., 2013) não foi aqui evidenciado como majoritário de nenhum acesso investigado.

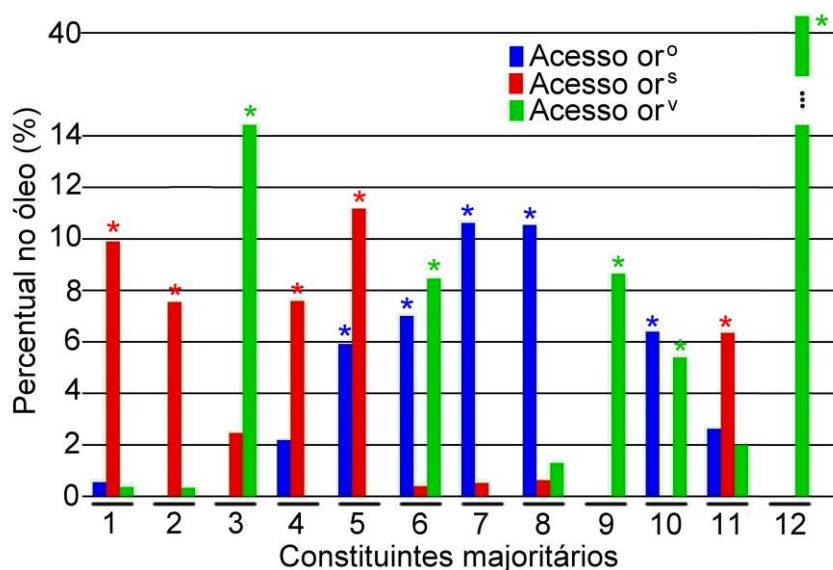


Figura 3 – Comparação entre as cinco substâncias majoritárias de cada um dos acessos de *L. origanoides* investigados. Em azul e assinalado por asteriscos azuis, os constituintes majoritários do acesso or^o, em vermelho (com asteriscos vermelhos) do acesso or^s e em verde (com as asteriscos verdes) do acesso or^v. Compostos majoritários: 1) α -pineno; 2) α -felandreno; 3) α -cimeno; 4) limoneno; 5) 1,8-cineol; 6) γ -terpinenol; 7) trans-hidrato de sabineno; 8) 4-terpinenol; 9) metil éter de timol; 10) Timol; 11) β -cariofileno e 12) carvacrol.

Entretanto, o timol se apresentou entre os cinco compostos majoritários nos acessos or^o e or^v. O 1,8-cineol encontrado aqui como composto majoritário do acesso or^s já foi previamente relatado como o composto majoritário justamente em *L. sidoides* (MORAIS et al., 2012).

Os resultados obtidos na análise do índice mitótico (IM) após a exposição aos óleos essenciais das espécies de *Lippia* são mostrados na Figura 4. Para *L. alba* (Figura 4A), efeitos significativos (reduções dos IMs em comparação com os controles) foram observados para os tratamentos iguais ou superiores a 100 μ g/mL. As maiores reduções, observadas nos tratamentos com as concentrações mais elevadas (300 e 400 μ g/mL) foram respectivamente de 76,96% e 75,39% em relação à média dos controles negativos (CN1 e CN2). Estas foram maiores até do que a redução observada para o controle positivo (CP) que foi de 70,47% em relação à média dos controles negativos (CN1 e CN2).

Já para *L. origanoides*, acesso or^o (Figura 4B) o efeito sobre o ciclo celular não foi tão pronunciado como aquele observado para *L. alba* (Figura 4A). Para o acesso or^o apenas a maior concentração reduziu o índice mitótico em 30,69% em relação à média dos controles negativos (CN1 e CN2) (Figura 4B). Neste caso a redução foi menor do que a observada para o controle positivo (CP).

Para os acessos or^s e or^v os efeitos foram bem maiores do que aqueles observados para o acesso or^o (Figuras 4C e 4D) Após a exposição aos tratamentos do acesso or^s, efeitos significativos (reduções dos IMs em comparação com os controles) foram observados para tratamentos iguais ou superiores a 100 µg/mL (Figura 4C), sendo esta mesma observação verdade para todos os tratamentos do acesso or^v (Figura 4D).

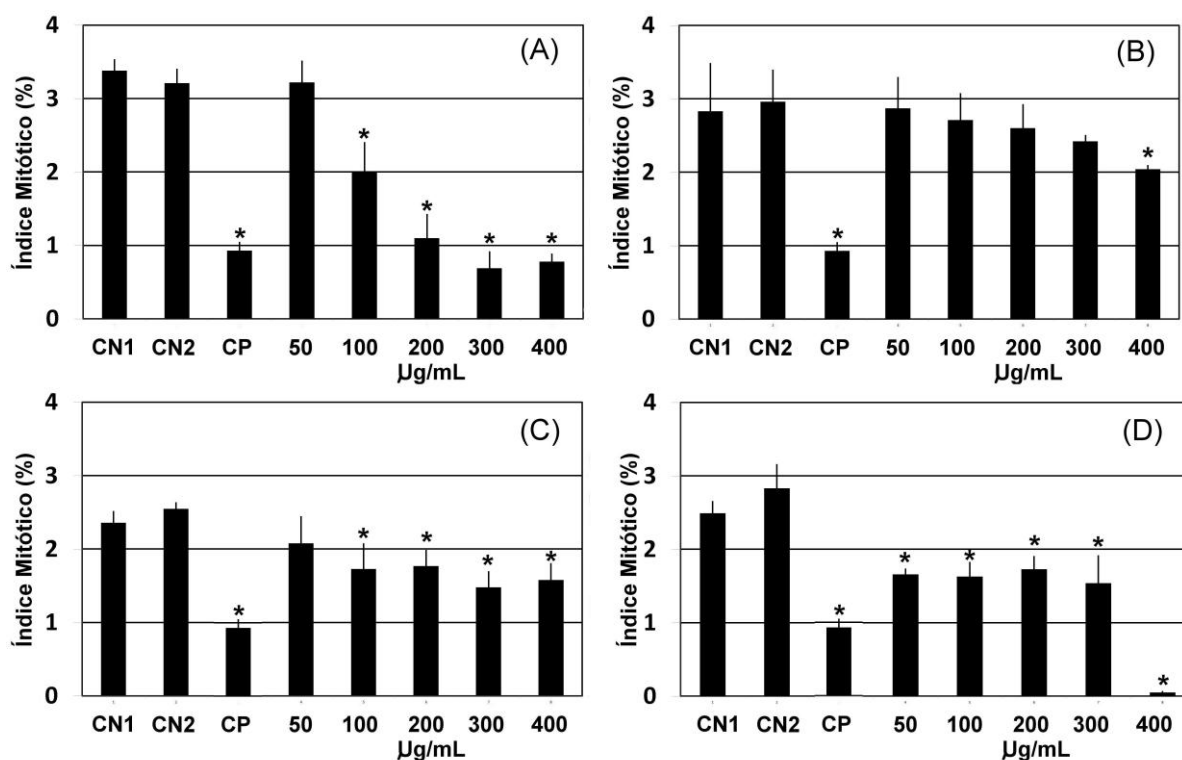


Figura 4 – Análise do ciclo celular após exposição ao óleo essencial de espécies de *Lippia*. (A, B, C e D) representam, respectivamente o Índice Mitótico dos acessos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lippia sidoides* e *Lippia velutina*. Controles negativos: CN1 (água destilada), CN2 (acetona 2,5%). Controle positivo: CP (MMS $4 \times 10^{-4}M$). Concentrações: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL e 400 µg/mL. Médias seguidas por um asterisco (*) são significativamente diferentes dos controles negativos (Dunnett, $p < 0,05$).

Considerando todos os tratamentos com efeitos significativos (reduções dos IMs em comparação com os controles) dos acessos or^s e or^v, as reduções médias

dos IMs foram 32,09% e 51,87% respectivamente, evidenciando um maior efeito do acesso or^v.

O Índice Mitótico (IM), caracterizado pelo percentual de células em divisão, tem sido usado como um parâmetro para acessar a citogenotoxicidade de diversos constituintes. Os índices mitóticos significativamente menores do que os controles negativos podem indicar uma ação sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto ao agente testado (LEME e MORALES, 2009). Este efeito foi relatado neste trabalho para todos os óleos investigados, em concentrações iguais ou superiores a 100 µg/mL para *L. alba* e o acesso or^s de *L. origanoides* e 50 µg/mL para o acesso or^v de *L. origanoides*. Já para o acesso or^o este efeito foi significativo somente para a maior concentração testada (400 µg/mL). O mesmo efeito de redução no percentual de células em divisão já foi relatado em inúmeros trabalhos que avaliaram a citogenotoxicidade de óleos essenciais de plantas, como do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* (MORADSHAHI et al., 2003), *Salvia leucophylla* (NISHIDA et al., 2005), *Heterothalamus psiadioides* e *Heterothalamus alienus* (SILVA et al., 2011) e *Schinus lentiscifolius* (PAWLOWSKI et al., 2012).

Adicionalmente à análise do Índice Mitótico (IM), a análise dos percentuais de células em cada uma das fases da divisão celular (Índices de Fases) pode fornecer informações úteis para o entendimento dos efeitos observados para os agentes testados. Para *L. alba*, observou-se, de um modo geral, aumento dos percentuais de prófase, acompanhado de reduções das demais fases em concentrações iguais ou superiores a 200 µg/mL (dados não mostrados).

Para os acessos or^s e or^v de *L. origanoides*, foram observados aumentos nos percentuais de células em anáfase e metáfase respectivamente, sendo estes observados em tratamentos iguais ou superiores à concentração de 100 µg/mL (dados não mostrados). Já para o acesso or^o, não foram observados interferências sobre os percentuais de fases em relação aos controles.

O aumento no percentual de prófase, foi também relatado por Kurás et al. (2009) em células meristemáticas de *Allium cepa* após o tratamento com extrato aquoso da casca de *Uncaria tomentosa*. Segundo estes autores este efeito pode representar um bloqueio no ponto de checagem entre prófase e metáfase, chamado de ponto Chfr, como descrito por Scolnic e Halazonetis (2000). Estes autores demonstraram este efeito em células tratadas com um composto que induz despolimerização dos microtúbulos (noctodasol). A observação de diversas

alterações relacionadas ao mau funcionamento do fuso mitótico nos resultados aqui encontrados pode corroborar esta hipótese de bloqueio no ponto de checagem Chfr. Estas alterações são discutidas adiante. O aumento do percentual de anáfase pode ser um indicativo de interferência sobre a velocidade de divisão celular, uma vez que esta é uma das fases mais curtas do processo mitótico. Já o bloqueio em metáfase e o conseqüente aumento no percentual de células nesta fase pode ser uma consequência da ocorrência de cromossomos aderentes (discutidos adiante).

Os resultados obtidos na análise de alterações cromossômicas são mostrados nas Tabelas 3 a 6. Dentre as alterações cromossômicas investigadas, foram observados efeitos significativos para pelo menos um dos tratamentos com óleo essencial em cromossomos aderentes, perda de cromossomos, pontes cromossômicas e segregação tardia.

Dois tipos de alterações cromossômicas podem ser evidenciados: aneugênico e clastogênico. As alterações aneugênicas resultam dos efeitos sobre a segregação normal dos cromossomos, como aquelas causadas por interferências sobre a função normal dos microtúbulos formadores do fuso mitótico, gerando células aneuploides e poliploides (LAUGHINGHOUSE, 2012). Já as alterações clastogênicas são aquelas relacionadas à ocorrência de quebras no DNA (LEME e MORALES, 2009).

Segregação tardia (Figura 5) foi a alteração que demonstrou os maiores aumentos em relação aos controles (Tabelas 3 a 6). Para o acesso or^o de *L. origanoides* esta alteração não demonstrou aumentos significativos, mas para os demais óleos investigados (*L. alba* e acessos or^s e or^v de *L. origanoides*), considerando todos os tratamentos com efeitos significativos, o aumento médio em relação à média dos dois controles negativos (CN1 e CN2) foi de 4,06X (Tabelas 3 a 6).

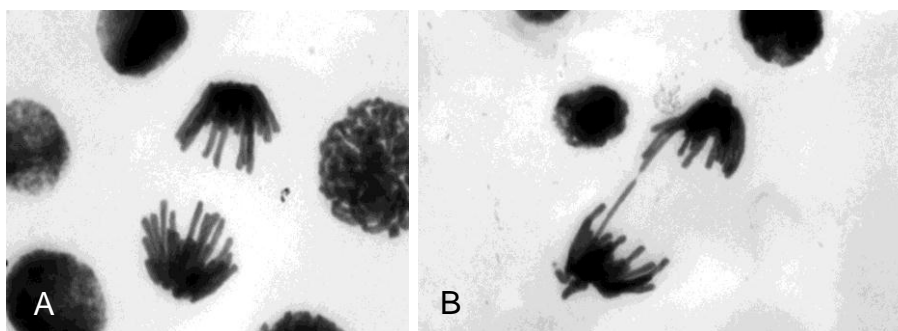


Figura 5 – Em (A) Segregação normal dos cromossomos em uma anáfase típica; (B) Segregação tardia de cromossomos em anáfase.

Tabela 3 - Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.

Tratamentos	Alterações cromossômicas			
	Aderentes	Perda cromossômica	Ponte cromossômica	Segregação tardia
CN1	7,55	1,20	1,91	4,21
CN2	9,44	1,46	2,64	5,47
50 µg/mL	12,67*	2,07*	4,12*	15,78*
100 µg/mL	21,92*	3,15*	5,96*	16,73*
200 µg/mL	17,89*	8,11*	0	19,82*
300 µg/mL	42,53*	4,95*	0	21,34*
400 µg/mL	46,31*	0	0	0
CP	37,89*	4,84*	16,65*	18,70*

CN1 - Controle negativo 1 (dH₂O); CN2 – Controle negativo 2 (Acetona 2,5%); CP – Controle positivo – MMS 0,0004M; * Diferença significativa em relação ao controle negativo de água destilada (dH₂O).

Tabela 4 – Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentrações de óleo essencial do acesso or^o de *Lippia origanoides*.

Tratamentos	Alterações cromossômicas	
	Aderentes	Ponte cromossômica
CN1	3,25	2,78
CN2	2,65	2,89
50 µg/mL	9,72*	5,76*
100 µg/mL	9,75*	5,43*
200 µg/mL	11,34*	4,74*
300 µg/mL	9,24*	3,67
400 µg/mL	7,89*	9,65*
CP	37,89*	16,65*

CN1 - Controle negativo 1 (dH₂O); CN2 – Controle negativo 2 (Acetona 2,5%); CP – Controle positivo – MMS 0,0004M; * Diferença significativa em relação ao controle negativo de água destilada (dH₂O).

Tabela 5 – Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentrações de óleo essencial do acesso or^s de *Lippia organoides*.

Tratamentos	Alterações cromossômicas			
	Aderentes	Perda cromossômica	Ponte cromossômica	Segregação tardia
CN1	8,48	0,92	5,34	3,63
CN2	9,48	1,11	4,02	3,10
50 µg/mL	16,59*	2,03*	9,83*	11,94*
100 µg/mL	19,63*	1,87*	11,34*	12,64*
200 µg/mL	31,54*	3,92*	13,23*	11,07*
300 µg/mL	29,37*	2,78*	16,13*	22,91*
400 µg/mL	32,41*	2,95*	15,41*	18,29*
CP	37,89*	4,84*	16,65*	18,70*

CN1 - Controle negativo 1 (dH₂O); CN2 – Controle negativo 2 (Acetona 2,5%); CP – Controle positivo – MMS 0,0004M; * Diferença significativa em relação ao controle negativo de água destilada (dH₂O).

Tabela 6 – Alterações cromossômicas após exposição de células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentrações de óleo essencial do acesso or^v de *Lippia organoides*.

Tratamentos	Alterações cromossômicas			
	Aderentes	Perda cromossômica	Ponte cromossômica	Segregação tardia
CN1	6,10	1,12	1,18	4,21
CN2	6,00	0,89	2,41	5,47
50 µg/mL	17,83*	1,23	5,20*	15,78*
100 µg/mL	13,31*	0,68	5,64*	16,73*
200 µg/mL	20,5*	1,99	5,78*	19,82*
300 µg/mL	20,9*	3,02*	8,32*	21,34*
400 µg/mL	0	0	0	0
CP	37,89*	4,84*	16,65*	18,70*

CN1 - Controle negativo 1 (dH₂O); CN2 – Controle negativo 2 (Acetona 2,5%); CP – Controle positivo – MMS 0,0004M; * Diferença significativa em relação ao controle negativo de água destilada (dH₂O).

Comparando-se os três óleos (acessos *Lippia organoides*, *Lippia sidoides* e *Lippia velutina*) investigados com efeitos de segregação tardia os maiores aumentos foram encontrados como decorrência da exposição ao óleo do acesso or^s. Para este óleo todos os tratamentos (de 50 a 400 µg/mL) induziram aumentos significativos na ocorrência desta alteração. Em média, estes tratamentos aumentaram 4,57X o percentual desta alteração em relação à média dos dois controles negativos (CN1 e CN2) (Tabela 5). Neste mesmo óleo (acesso or^s) foi relatado o maior percentual de ocorrência de segregação tardia, 22,91% para o tratamento com 300 µg/mL, com um aumento de 6,81X em relação à média dos controles negativos (CN1 e CN2) (Tabela 5).

A ocorrência de segregação tardia dos cromossomos evidencia um provável efeito aneugênico dos óleos aqui investigados. Esta alteração é apontada como um efeito muito mais em decorrência de um problema na despolimerização dos microtúbulos do que na polimerização (FERNANDES et al., 2009). Neste caso, o encurtamento dos microtúbulos durante o processo de anáfase é afetado, conduzindo à segregação tardia de alguns cromossomos (FERNANDES et al., 2009). Curiosamente, este mesmo óleo (acesso or^s) aumentou o percentual de anáfases na análise de ciclo celular, corroborando os resultados aqui apresentados: provavelmente o atraso na segregação dos cromossomos em anáfase atrasa o tempo de ocorrência desta fase, aumentando assim o seu percentual na análise dos índices de fase.

Adicionalmente à segregação tardia, a ocorrência de perda de cromossomos também indica um efeito aneugênico dos óleos investigados neste trabalho (Figura 6). Assim como a segregação tardia, esta alteração foi observada após exposição aos óleos de *L. alba* e dos acessos or^s e or^v de *L. organoides* (Tabelas 3 a 6). Em média, todos os tratamentos com efeitos significativos aumentaram em 3,03X o percentual desta alteração (comparação realizada com a média dos dois controles negativos, CN1 e CN2) (Tabelas 3 a 6).

Para esta alteração, os maiores efeitos foram observados após exposição ao óleo de *L. alba*, onde os maiores aumentos em relação aos controles foram observados (Tabela 3). Como exemplo, o percentual desta alteração após exposição ao tratamento de 200 µg/mL em *L. alba* foi 6,10X superior aos encontrados nos dois controles negativos, CN1 e CN2 (considerando a média dos mesmos) (Tabela 3). A não formação correta do fuso mitótico, pode induzir a perda de cromossomos que

não se ligam ao fuso e, portanto não segregam (SHAMINA et al., 2003; GISSELSSON et al., 2004).



Figura 6 – Perda cromossômica em anáfase/telófase.

Paralelo a um efeito aneugênico, os óleos investigados neste trabalho podem também apresentar um efeito clastogênico, evidenciado pela ocorrência de pontes cromossômicas (Figura 7). Efeitos significativos para esta alteração foram observados em todos os óleos avaliados. Em média, todos os tratamentos com efeitos significativos aumentaram em 2,69X o percentual desta alteração (comparação realizada com a média dos dois controles negativos, CN1 e CN2) (Tabelas 3 a 6). Os maiores efeitos foram observados após exposição ao óleo do acesso or^v de *L. origanoides*, onde os maiores aumentos em relação aos controles foram observados (Tabela 6). Como exemplo, o percentual desta alteração após exposição ao tratamento de 300 µg/mL em or^v foi 4,64X superior aos encontrados nos dois controles negativos, CN1 e CN2 (considerando a média dos mesmos) (Tabela 6).



Figura 7 – Ponte cromossômica em anáfase.

As pontes cromossômicas podem se formar através da ocorrência de rearranjos cromossômicos com a formação de cromossomos dicêntricos, ou através

da ocorrência de quebras terminais nos cromossomos conduzindo à fusão de cromátides (SINGH, 2003). Neste caso, as pontes são classificadas como alterações clastogênicas, que são aquelas relacionadas à ocorrência de quebras no DNA (LEME e MORALES, 2009). Entretanto, não se observou efeitos significativos para quebras cromossômicas após a exposição aos óleos investigados.

A ocorrência de tais quebras deveria ser responsável também pelo aparecimento de micronúcleos (LEME e MORALES, 2009). Entretanto, também esta variável não evidenciou efeito significativo nas análises realizadas.

Os micronúcleos são corpúsculos similares ao núcleo principal, formados por cromossomos ou partes destes que se encontram dispersos no citoplasma (SILVA e NEPOMUCENO, 2010). Surgem como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos (efeito clastogênico) ou da perda de cromossomos inteiros (efeito aneugênico) que não se ligam ao fuso e, assim, não chegam aos pólos da célula durante os processos de mitose ou meiose (MENEGUETTI et al., 2011). O fragmento cromossômico acêntrico ou o cromossomo inteiro não se integram ao novo núcleo e podem constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (FENECH, 1993; COSTA e MENK, 2000). A análise do tamanho dos micronúcleos permite inferir e distinguir sobre a existência de efeitos clastogênicos e aneugênicos. De um modo geral, a perda de fragmentos cromossômicos conduz à formação de micronúcleos menores que a perda de cromossomos inteiros. A relação entre o tamanho dos micronúcleos e o núcleo celular permite a distinção destes efeitos.

Nos resultados aqui descritos, esta análise não foi efetuada e a mesma encontra-se em realização neste momento, na tentativa de correlacionar os micronúcleos observados com a perda de cromossomos (efeito aneugênico). Diante desta hipótese, as pontes cromossômicas aqui discutidas como um dos efeitos não seria consequência de um efeito clastogênico, como de costume.

Uma hipótese alternativa seria o surgimento de pontes através de aderência cromossômica. Marcano et al. (2004) salientam que a aderência da cromatina também pode determinar pontes cromossômicas, uma vez que os cromossomos tendem a permanecer unidos. Giacomelli (1999) salienta que as pontes formadas por aderência podem ser múltiplas e ainda persistir até a fase de telófase.

A ocorrência de cromossomos aderentes foi um importante efeito após exposição aos óleos testados neste estudo. A ocorrência de aumentos significativos

nos percentuais de cromossomos aderentes (Figura 8), assim como para pontes cromossômicas, foi observada em todos os óleos avaliados neste estudo (Tabelas 3 a 6). Considerando os tratamentos com efeitos significativos para cromossomos aderentes, aumento médio de 3,11X foi observado em relação à média dos dois controles negativos (CN1 e CN2). Neste caso, os maiores aumentos foram relatados para os tratamentos com óleo de *L. alba*. Os cromossomos aderentes são consequência de um efeito tóxico sobre a organização da cromatina, mais precisamente sobre a matriz proteinácea da cromatina, sendo muitas vezes um efeito irreversível que conduz a morte celular (FISKESJÖ e LEVAN, 1993; MARCANO e DEL-CAMPO, 1995; MARCANO et al., 1998; FERNANDES et al., 2009). A presença de aderência cromossômica em comparação com outras alterações, também foi relatada por Silva et al. (2011), em um estudo sobre a efeito citotóxico de óleos essenciais de duas espécies de *Heterothalamus* (Asteraceae).

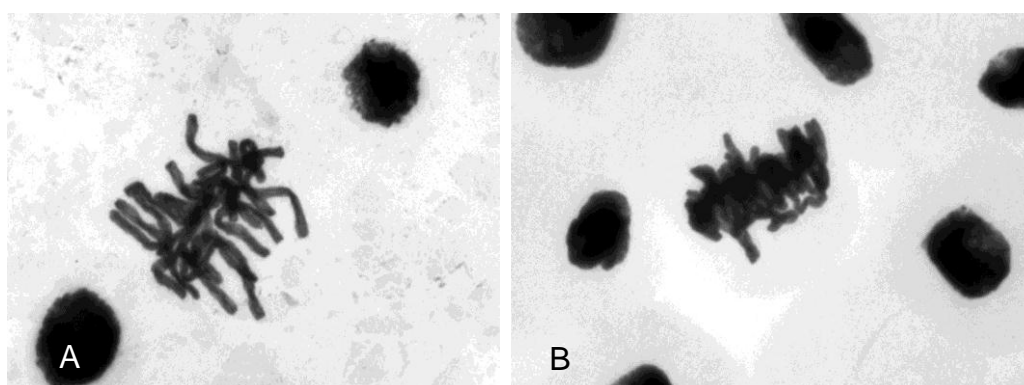


Figura 8 – Em (A) metáfase normal; em (B) aderência cromossômica em metáfase.

Os resultados até aqui apresentados e discutidos evidenciam um efeito citogenotóxico dos óleos investigados. Muitos dos compostos encontrados nos óleos destas espécies já foram demonstrados como possuindo este tipo de efeito. O carvacrol, composto majoritário do acesso or^v aqui investigado e o timol, composto majoritário dos acessos or^v e or^o são conhecidos por apresentarem efeitos biológicos possivelmente relacionados às atividades aqui investigadas. Botelho et al. (2007) demonstrou atividade antimicrobiana de um óleo extraído de *Lippia sidoides*, rico em timol (56,70%) e carvacrol (16,70%). Periago et al. (2001) relataram que o carvacrol e o timol não causaram inibição expressiva do crescimento de *Bacillus cereus*, quando foram aplicados separadamente.

Por outro lado, outros trabalhos têm demonstrado que o carvacrol utilizado sozinho era mais eficiente contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. typhii* e *B. subtilis* do que o extrato feito a partir de folhas de *Lippia multiflora* (KUNLE 2003). Os óleos essenciais ricos em compostos fenólicos tais como timol e carvacrol exibem forte atividade antimicrobiana provocando distúrbios estruturais na membrana plasmática e na parede celular dos microrganismos (BURT, 2004). Farias Junior et al. (2012) avaliaram os efeitos *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* ricos em timol e carvacrol sobre *Leishmania ssp.* (agente etiológico da Leishmaniose, doença que afeta mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo). Como resultado foi demonstrado que ambos os óleos essenciais mostraram atividade significativa contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, no entanto, verificou-se que o óleo essencial rico em carvacrol foi mais eficaz em comparação com o óleo rico em timol.

Em outro estudo, Lima et al. (2011) caracterizaram e quantificaram a composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*, bem como avaliaram sua atividade inseticida por teste de fumigação sobre *Tenebrio molitor*. Além disso, a toxicidade dos monoterpenos carvacrol, timol e 1,8-cineol também foi avaliada quando esses constituintes foram aplicados isoladamente, ou em misturas binárias (1:1), ou terciárias (1:1:1). Destaca-se aqui que o 1,8-cineol também se mostrou como um constituinte majoritário nos óleos essenciais dos acessos or^o e or^s de *L. organoides*. Segundo estes autores, verificou-se que o óleo essencial de *Lippia sidoides* tem atividade inseticida contra *T. molitor*, bem como os monoterpenos carvacrol, timol e 1,8-cineol. Quando as diferentes substâncias foram avaliadas separadamente, verificou-se um efeito sinérgico. O efeito sinérgico do timol pode ser usado para aumentar a toxicidade de carvacrol e 1,8-cineol. Uma observação interessante a este respeito é que neste estudo quando se comparam os efeitos observados para os 3 acessos investigados de *L. organoides*, os efeitos são intensificados para o óleo obtido do acesso or^v, justamente aquele em que o timol e o carvacrol configuram juntos como compostos majoritários, reforçando a hipótese apresentada por Lima et al. (2011). Do mesmo modo o timol se apresenta juntamente com o 1,8-cineol como compostos majoritários do óleo do acesso or^o, assim com a possibilidade de efeitos sinérgicos entre os dois constituintes. Outros trabalhos têm demonstrado ainda atividades antimicrobianas para o 1,8-cineol

(OUATTARA et al., 1997; BARATTA et al., 1998; GACHKAR et al., 2007; TYAGI e MALIK, 2010; AZERÊDO et al., 2011).

A respeito das atividades genotóxicas, Azirak et al. (2008) demonstraram que tanto o timol quanto o carvacrol apresentam atividades genotóxicas pelo ensaio de micronúcleos em medula óssea de roedores. Reduções do índice mitótico das células, indução de alterações cromossômicas e de micronúcleos foram evidenciados nas células analisadas.

Pawlowski et al. (2012) estudaram a atividade citogenotóxica do óleo extraído de *Schinus lentiscifolius* sobre células meristemáticas de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. O óleo desta espécie apresentou como um dos constituintes majoritários o limoneno, também presente como um dos constituintes majoritários do óleo do acesso or^s. Já Silva et al. (2011) estudaram as atividades citogenotóxicas do óleo essencial de duas espécies de *Heterothalamus* (*Heterothalamus psiadioides* e *H. alienus*) em *Lactuca sativa* e demonstraram efeitos sobre o ciclo celular e indução de alterações cromossômicas. Estes autores demonstraram ainda a citogenotoxicidade do β -pineno, constituinte encontrado nos óleos aqui investigados somente nos acessos or^o e or^s de *L. origanoides*, mas em baixos percentuais.

Mademtozoglou et al. (2013) demonstraram o efeito genotóxico do γ -terpineno e do terpinoleno no *Wing Spot Test* em *Drosophila*. Já Süleyman et al. (2012) encontraram um aumento na frequência de aberrações cromossômicas, micronúcleo, células apoptóticas, necróticas e binucleadas após exposição de linfócitos humanos em cultura ao óleo essencial de *Urtica dioica*. Neste trabalho o constituinte majoritário do óleo foi o carvacrol, o mesmo constituinte encontrado como majoritário no óleo do acesso or^v de *L. origanoides*. Bozari et al. (2014) analisaram o efeito citogenotóxico do óleo essencial de *Nepeta nuda* em células meristemáticas de *Zea mays*. Inibição do crescimento das raízes e parte aérea foi observada em uma resposta concentração dependente. Os autores demonstraram ainda genotoxicidade do óleo utilizando RAPD como ferramenta de análise. O óxido de cariofileno, um dos compostos majoritários de *L. alba* não demonstrou atividade genotóxica pelo teste de Ames e pelo ensaio de micronúcleo (DI SOTTO et al., 2013).

Independente do conhecimento de atividades genotóxicas positivas ou negativas para algumas das substâncias majoritárias encontrados nas espécies investigadas, não se descarta o envolvimento de outros constituintes de uma forma

sinérgica nos efeitos aqui investigados. Nosso grupo de pesquisa tem procurado iniciar trabalhos no sentido de caracterizar a ação citogenotóxica de algumas destas constituintes.

Os resultados obtidos sugerem cautela no uso de espécies de *Lippia* na medicina popular. Por outro lado, estes efeitos permitem o uso destas plantas como fontes de substâncias biologicamente ativas, com aplicações na medicina, biologia e agrárias, como por exemplo, utilizadas como antibióticos, inseticidas ou antimetabólicos. A aplicação destes resultados em aspectos de alelopatia também é possível e deve ser considerado.

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir, de acordo com os resultados aqui apresentados que os óleos extraídos de algumas espécies de *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia origanoides*, acessos: *Lippia sidoides* e *Lippia velutina*) apresentam atividades citogenotóxicas, principalmente relacionados ao mau funcionamento do fuso mitótico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A. BARBOSA, S. 2011. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente e Água**. v. 6, n. 2.

AVILA-SOSA, R.; GASTÉLUM-FRANCO, M. G.; CAMACHO-DÁVILA, A.; TORRES-MUÑOZ, J. V.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V. 2010. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technology** 3: 434–440.

AZERÊDO, G. A., STAMFORD, T. L. M., NUNES, P. C., NETO, N. J. G., OLIVEIRA, M. E. G., SOUZA, E. L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International** 44, 1541–1548.

AZIRAK, S.; RENCUZOGULLARI, E. 2008. The In Vivo Genotoxic Effects of Carvacrol and Thymol in Rat Bone Marrow Cells. **Environmental Toxicology**. 33: 728-735.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p 446-475.

BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., RUBERTO, G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal** 13, 235–244.

BLANCO, M. A.; COLAREDA, G. A.; VAN-BAREN, C.; BANDONI, A. L.; RINGUELET, J.; CONSOLINI, A. E. 2013. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, 149: 803-809.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40 (3): 349-356.

BOZARI, S.; AGAR, G. AKSAKAI, O.; ERTURK, F. A.; YANMIS, D. 2014. Determination of chemical composition and genotoxic effects of essential oil obtained from *Nepeta nuda* on *Zea mays* seedlings. **Toxicology and Industrial Health** **29**: 339–348.

BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. **International Journal of Food microbiology**, v.94: 223-53.
CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. **148**: 288-294.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. 2008. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, **72**: 727-725.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. 2012. Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother**, **46**: 1914-1920.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO-FILHO, J. L. S.; SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. 2013. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. **36(2)**: 241-244.

CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. **101**: 829–832.

COSTA, R. M. A; MENK, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia Ciência e Movimento**, **12**.

COSTA, S. M. O, LEMOS, T. L. G., MONTE, F. J. Q., MATOS, F. J. A. 1998. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de Plantas Mediciniais**, Resumos, Águas de Lindóia.

DI SOTTO, A.; MAFFEI, F.; HRELIA, P.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, G. M.; MAZZANTI, G. 2013. Genotoxicity assessment of β -caryophyllene oxide. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, V. **66**: 264-268.

DONG, Y.; ZHANG, J. 2010. Testing the genotoxicity of coking wastewater using *Vicia faba* and *Hordeum vulgare* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. In press.

DUA, K. V.; KUMAR, A.; PANDEY, C. A.; KUMAR, S. 2013. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Saym 1823. **Parasites e Vectores**, v.6: 30 1-8.

ESCOBAR, P.; LEAL, S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105(6): 184-190.

FARIAS, G. F. M. E.; XIMENES, M. R.; MAGALHÃES, M. P. L.; CHIAPPETA, A. A.; SENA, R. F. X. K.; ALBUQUERQUE, C. F. J. 2012. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida species*. **Journal of Herbal Medicine**, v.2(3): 63-67.

FARIAS-JUNIOR, P. A.; RIOS, M. C.; MOURA, T. A.; ALMEIDA, R. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; FERNANDES, R. P. M.; SCHER, R. 2012. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biology Research**, v. 45: 399-402.

FENECH, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, 285: 35 -44.

FERNANDES, T. C. C., MAZZEO, D. E. C., MARIN-MORALES, M. A., 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent— trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72: 1680–1686.

FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; SILVA, T. B.; MACHADO, W. J.; PRATA, A. P. N.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20(7): 615-621.

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

FISKESJO, G.; LEVAN, A. 1993. Evaluation of the first ten MelC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, **21**: 139–149.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. **59**: 934-940.

FUNARI, C. S.; GULLO, P. F.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R. L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PIACENTE, S. PIZZA, C.; SILVA, D. H. 2012. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, **135**(3): 2086-94.

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S.A., RASOOLI, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry** **102**: 898–904.

GADEVA, P.; DIMITROV, B. 2008. Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaries* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **652**: 191-197.

GIACOMELLI, F. R. B. 2004. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul**. Dissertação de Mestrado em Genética – Universidade Estadual de Maringá, PR. 131p.

GISSELSSON, D.; PALSSON, E.; YU, C.; MERTENS, F.; MANDAHL, N. 2004. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. **Cancer Letters**, **206**: 69–76.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. 2012. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. **111**: 2423-2430.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. 2011. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. **36**(1): 64-77.

GRANT, W. F. 1994. The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental mutagens. **Mutat. Res**, **310**: 175–185. 1994.

GRANT, W.F.; OWENS, E.T. 2006. *Zea mays* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, **613**: 17-64.

GUSTAFSON, F. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; WHYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Left. Appl. Microbiol**, **26**: 167-171.

HATANO, V. Y.; TORRICELLI, A. S.; GIASSI, A. C. C.; COSLOPE, L.A.;VIANA, M. B. 2012. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. **45(3)**: 179-290.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal Ethnopharmacol**, **116**: 211–222.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. 2009. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **72**: 2090-2095.

HWANG, S. E.; KIM, G. H. 2012. Safety evaluation of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil by assessing micronucleus abnormalities, mutagenicity, and chromosomal aberration. **Food Research international**, V. **47(2)**: 267-271.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. 2011. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13(3): 258-264.

JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F. 2006. Composição química do óleo essencial de três espécies do gênero *Lippia* cultivadas em Sergipe. IN: 33° **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**.

KELEC, G.; MUTLU, S.; ALPSOY, L.; SAKÇALI, S. M.; ATICI, O. 2013. Genotoxic effects of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) essential oils on some weed and crop plants. **Toxicol Ind Health**, V. **29(6)**: 504-513.

KUNLE, O. 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v.10: 59-61.

KURAS, M.; NOWASKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, 107: 211-221.

KURAS, M.; PILARSKI, R.; NOWASKOWSKA, J.; ZOBEL, A.; BRZOST, K.; ANTOSIEWICZ, J. GULEWICZ, K. 2009. Effect of Alkaloid-Free and Alkaloid-Rich preparations from *Uncaria tomentosa* bark on mitotic activity and chromosome morphology evaluated by *Allium* Test. **Journal of Ethnopharmacology**, 12: 140-147.

LAUGHINGHOUSE, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V.D.S.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. 2012. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, 432: 180–188.

LEME, D. M.; MORALES, M. A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682: 71-81.

LIJU, B. V.; JEENA, K.; KUTTAN, R. 2013. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food and Chemical Toxicology**, V. 53: 52-61.

LIMA, K. R.; CARDOSO, G. M.; MORAES, C. M. S.; RODRIGUES, G. V.; GUIMARÃES, L. G. L. 2011. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). **Ciências Agrotec. Lavras**, v.35(4): 664-671.

LÓPEZ, A. M.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, L. J. 2011. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**. V.34(3): 479-488.

MA, T-H. ; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL , H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. 1995. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334:185–195.

MADEMTZOGLU, D.; PAVLIDOU, T.; BAZIOTI, M. G.; KOUTSONIHOW, E. L.; AKMOUTSOU, P.; DROSOPOULOU, E.; VOKOU, D.; TSIPIDOU, M. P.; 2013. Assessment of the genotóxico potential of essential oil constituents by the *Drosophila* wind spot test. **Flavour and Fragrance Journal**, V. **28(3)**: 188-194.

MARÇAL, R. M.; PTAK, D. M.; KREMPSER, R. R.; KREMPSER, M. R.; CARDOSO, G. C.; SANTOS, R. B.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. 2006. Antinociceptive effect of the essential oil *Lippia sidoides* on mice. **Planta Medica**, **72**: 291.

MARCANO, L.; DEL-CAMPO, A. 1995. Studio ultrastructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebola *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciencia**, **3**: 73–82.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. 1998. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio em poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebola). **Ciencia**, **6**: 93–99.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL-CAMPO, A.; MONTIEL, X. 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. **Environmental Research Letters**, **94**: 221–226.

MARX, H.; O'LEARY, N.; YUAN, Y.; LU-IRVING, P.; TANK, D.; MÚLGURA, M.E.; OLMSTEAD, R. 2010. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**. **97**: 1647–1663.

MEDEIROS, F. G. M.; SILVA, C. A.; CITÓ, L. G. M. A.; BORGES, R. A.; LIMA, G. S.; LOPES, D. A. J.; FIGUEIREDO, Q. B. C. R. 2011. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.**60(3)**: 237-241.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilllis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. **129**: 391-397.

MENEGUETTI, D.U.O.; SILVA, F.C.; PELLEZZI, D.C.; SOUZA, N.C.; RAMOS, L.J. 2011. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa* to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari, Rondônia, Brazil. **X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)**. São Pedro – SP.

MONTEIRO, B. V. M.; LEITE, M. R. K. A.; BERTINI, M. L.; MORAIS, M. S.; NUNES-PINHEIRO, S. C. D. 2007. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111(2): 378-382.

MORADSHAHI, A., GHADIRI, H., EBRAHIMIKIA, F. 2003. Allelopathic effects of crude volatile oil and aqueous extracts of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. leaves on crops and weeds. **Allelopathy Journal** 12, 189–196.

MORAIS, L. A. S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27(2): 4050-4063.

MORAIS, S. R.; OLIVEIRA, T. L. S.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. 2012. Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, doi: 10.1155/2012/363919.

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; COSTA, J. G. M.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O.; SILVA, L. F. R.; POHLIT, A. M.; ANDRADE-NETO, V. F. A. 2012. In Vitro and In Vivo Antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78: 658-664.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. 2007. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28(3): 273 – 278.

O'LEARY, N.; DENHAM, S.S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M.E. 2012. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 170: 197–219.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101: 236–240.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; SUZANA, G. L. 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108: 103–108.

OLIVEIRA-MARTINS, C.R.; GRISOLIA, C.K. 2009. Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. **Genetics and Molecular Biology**, **32**: 853-856.

OLIVEIRA, V. C. S.; MOURA, D. M. S.; LOPES, J. A. D.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, C. B. Q. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. **104**: 1053-1059.

OUATTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A., PIETTE, G.J.P., BEGIN, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology** **37**: 155–162.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Prot.** **69**: 1046-1055

OWOLABI, N. M. S.; OGUNDAJO, A.; LAJIDE, L.; OLADIMEJI, M. O.; SETZER, W. N.; PALAZZO. M. C. 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lippia multiflora* Moldenke. **Records of Natural Products**, **3**(4): 170-177.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ- MATA, D.; VILLAR, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. **76**: 201- 214.

PAWLOWSKI, Â. SANTOS-KALTCHUK, E. ZINI, C. A. CARAMÃO, E. B. SOARES, G. L. G. 2012. Essential oils of *Shinus terebinthifolius* and *S. molle* (anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic incucers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany** **80**: 96-103.

PEREIRA, T.S.; SANT'ANA, J. R.; SILVA, E. L.; PINHEIRO, A. L.; CASTRO-PRADO, M. A. 2014. In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal Ethnopharmacol**, v. **151**(2): 852-7.

PERIAGO, P. M.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P. S. 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science Technology International**, v.**7**(6): 487-92.

QUIROGA, P. R.; GROSSO, N. R.; LANTE, A.; LOMOLINO, G.; ZYGADLO, J. A.; NEPOTE, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. **International Journal of Food Science & Technology**, **48 (3)**: 642–649.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JÚNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. 2012. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21(3): 185-191.

SALIMENA, F. R. G. 2000. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodo Lippia* (Verbenaceae)**. 582 p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SALIMENA, F. R. G.; THODE, V.; MULGURA, M.; O'LEARY, N.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S. 2013. *Verbenaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15170>).

SCOLNICK, D.M.; HALAZONETIS, T. 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. **Nature**, **406**: 430-435.

SHAMINA, N.V.; SILKOVA, O.G.; SERIUKOVA, E.G. 2003. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biology International**, **27**: 657–664.

SHIKANGA, E.A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. 2010. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany** **76**: 567–571.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P. DUBEY, N.K. 2009. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B₁ production. **International Journal of Food Microbiology**. **135**: 165-170.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. 2010. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelod usmaculatus*) do rio Paranaíba. Perquirere, Patos de Minas. Centro Universitário de Patos de Minas. **Unipam**, **7(1)**: 167-179.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. 2006. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. **8(3)**: 52-55.

SILVA, V.S.; PAWLOWSKI, A.; SANTOS, E.K.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G. 2011. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, **59(7)**: 682-691.

SINGH, R.J., 2003. **Plant Cytogenetics**. CRC Press, Boca Raton.

SMALA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TONAN, M.J. 1996. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, **368**: 171-179.

SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônica**. **3**: 109-123.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. **62**.

SÜLEYMAN, G.; DEMIRCI, B.; BASER, K.; AKPULAT, H.; AKSU, P. 2012. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, **88**: 666-672.

TEERARAK, M.; BHINIJA, K.; THITAVASANTA, S.; LAOSINWATTANA, C. 2009. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**, **121**: 228-232.

TYAGI, A.K., MALIK, A., 2010. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**. **143**, 205–210.

VALENTIN, A.; PELISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M. & BESSIERE, J. M. 1995. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, **40 (5)**: 1439-1442.

VASCONCELOS, A. L. C. F. 2006. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre 54razilian54 gastrintestinais de ovinos**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. 2013. Tropical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. **27**: 179-185.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F.; COLARES, V. A.; MENEZES, A. R. I.; COUTINHO, M. D. H.; COTELHO, A. M.; COSTA, M. G. J. 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. **83(3)**: 508-512.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEINICKE, A. R.; CASTILHO, R. F. 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci. Rep.** **17**: 43-52.

VICUÑA, C. G.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, L. J. 2010. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v.**81(5)**: 343-349.

YILDIZ, M.; CIGERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, **75**: 934-938.