

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO INFUSO DE MALVA-SANTA *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) SOBRE O CICLO CELULAR DE *Allium cepa*

Cleirton Martins Bezerra^{1*}, Caroline Matias Nascimento Dinelly¹

Maria Auxiliadora Silva Oliveira¹

¹Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA

E-mail*: ecobio@zipmail.com.br

Submetido em: 27/07/2015

Aceito em: 29/06/2016

Publicado em: 31/12/2016

Resumo

este trabalho tem como objetivo analisar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do infuso de folhas de malva-santa (*Plectranthus barbatus*) em diferentes concentrações sobre o ciclo celular da cebola (*Allium cepa*). A metodologia consistiu na colocação das cebolas em contato com a infusão de malva-santa por um tempo. Em seguida, as cebolas foram medidas com uma régua, coradas e, por fim, analisadas no microscópio com objetiva de 40X. Os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos foram avaliados através da inibição do crescimento radicular, dos índices mitóticos, do surgimento de aberrações cromossômicas e da ocorrência de micronúcleos. Foi evidenciado o efeito tóxico sobre os meristemas radiculares, pois em todos os tratamentos, as raízes tiveram seu crescimento inibido. O efeito citotóxico foi constatado pela análise das médias dos índices mitóticos, onde ficou notório que todos os tratamentos analisados apresentaram diminuição significativa na divisão celular e consequente diminuição no índice mitótico. A genotoxicidade foi evidenciada através das duas maiores concentrações analisadas, pois apresentaram uma frequência de aberrações cromossômicas estatisticamente relevantes.

Palavras-chave: Bioindicador, Cebola, Plantas Medicinais.

Evaluation of toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) infused on the cell cycle of *Allium cepa*

Abstract

This work aims to analyze the possible toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the infusion of mauve-santa leaves (*Plectranthus barbatus*) in different concentrations on the cell cycle of onion (*Allium cepa*). The onions were placed in contact with the infusion of Malva-santa. After some time, they were measured with a ruler. Then, the same were fixed, stained and examined under a microscope with a 40X objective. Toxic, cytotoxic and genotoxic effects were assessed by inhibition of root growth, mitotic indices, appearance of chromosomal aberrations and the incidence of micronuclei. It became evident the toxic effect on the root meristems, as in all treatments, the roots had their growth inhibited. The cytotoxic effect was found through the analysis of the mitotic indexes average, where it was possible to see that all treatments analyzed showed a significant decrease in cell division and the consequent reduction in mitotic index. The genotoxicity was observed through two largest concentrations analyzed, because they presented a frequency of statistically significant chromosomal aberrations.

Keywords: Bioindicator, Onion, Herbs.

Evaluación de la toxicidad, la citotoxicidad y la genotoxicidad de la infusión de malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) en el ciclo celular de *Allium cepa*

Resumen:

Este trabajo tiene como objetivo analizar los posibles efectos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos de la infusión de hojas de malva-Santa (*Plectranthus barbatus*) en diferentes concentraciones en el ciclo celular de cebolla (*Allium cepa*). Las cebollas se pusieron en contacto con la infusión de Malva-santa, después de algún tiempo se midieron con una regla, luego se fijaron, tiñeron y se examinaron con un microscopio con una objetiva de 40X. Los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos se evaluaron por la inhibición del crecimiento radicular, índices mitóticos, la aparición de aberraciones cromosómicas y la incidencia de micronúcleos. Se evidenció efecto tóxico en los meristemas radiculares, como en todos los tratamientos, las raíces tuvieron su crecimiento inhibido. El efecto citotóxico fue constatado mediante el análisis de las medias de los índices mitóticos, donde se verificó que todos los tratamientos analizados presentaron disminución significativa en la división celular y, consecuente reducción en el índice mitótico. La genotoxicidad se observó a través de las dos mayores concentraciones analizadas pues presentaron frecuencia de aberraciones cromosómicas estadísticamente significativas.

Palabras claves: Bioindicador, cebolla, Plantas medicinales.

INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos os homens buscam na flora recursos que possam melhorar suas condições de vida, possibilitando-os uma maior longevidade. As plantas sempre foram utilizadas como alimento e matéria-prima e a ingestão errônea de algumas delas possibilitou a descoberta de algumas propriedades destes vegetais. Ao longo dos anos as plantas foram observadas e seus usos passados tradicionalmente para as gerações seguintes mantendo viva a cultura local⁽¹⁾.

Na atualidade o uso de plantas medicinais está cada vez mais difundido, seja pelo aspecto econômico ou social. Segundo Anibal (2007)⁽²⁾ as plantas medicinais são uma rica fonte de novas substâncias e de novos compostos ativos, que podem resultar em valiosos produtos para a cura de doenças. O uso de plantas medicinais nos Estados Unidos e na Europa, principalmente na Alemanha, é bem disseminado e contam com rigorosas normas para certificar as preparações vegetais e seus respectivos empregos⁽³⁾.

No entanto, no Brasil, apesar do uso de plantas medicinais ser bem difundido, ainda há, entretanto, uma preocupação sobre esta prática, pois mais estudos são necessários. Existem muitas drogas vegetais em nosso país que não possuem registros na literatura sobre seus metabólitos, propriedades químicas, farmacológicas e posologia que possam assegurar o uso pela população sem o risco de apresentar alguma reação indesejada⁽³⁾.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) julga importante a realização de mais ensaios pré-clínicos com as plantas medicinais e de seus princípios ativos com o intuito de assegurar a sua efetividade farmacológica e estabilidade medicamentosa⁽⁴⁾. De acordo com a OMS, em torno de 60-80% da população global nos países subdesenvolvidos, possuem as plantas medicinais como alternativa para remediar seus males, devido às dificuldades socioeconômicas ou impossibilidade de acesso aos médicos e, conseqüentemente, aos medicamentos alopatícos⁽⁵⁾.

Sem dúvida alguma as preparações com plantas medicinais são uma interessante, eficaz, barata e acessível opção terapêutica às populações mais carentes na busca por alívio de suas dores, moléstias e alguns males que assolam sua saúde. No entanto, o uso dos vegetais medicinais deve ser visto com cuidado, pois grande parcela das "preparações caseiras" ainda

necessitam de estudos mais específicos e aprofundados que possam assegurar cientificamente suas características farmacológicas e dose terapêutica. Somente após esses estudos, torna-se possível assegurar que determinada planta possa ser utilizada para o tratamento de certas patologias ou como terapia alternativa, sem oferecer risco algum à saúde do usuário, como por exemplo, a interação com medicamentos alopáticos e alimentos, intoxicação, genotoxicidade, entre outras reações indesejáveis⁽³⁾.

Atualmente, torna-se cada vez mais imprescindível a realização de pesquisas científicas com o objetivo de avaliar ou descobrir possíveis ameaças que o uso terapêutico de plantas medicinais possam acarretar para a população. Sendo assim, se faz necessário a utilização de novas ferramentas para este fim. A busca por atividade mutagênica, genotoxicidade, tornou-se importante devido ao largo consumo de drogas de origem vegetal. Para Silva, Erdtmann e Henriques (2003)⁽⁶⁾, genotoxicidade é uma área da genética que avalia como determinados agentes podem ocasionar mudanças na estrutura físico-química e alteração no DNA nuclear.

Dentre as 300 espécies de ervas e arbustos perenes que constituem a família Lamiaceae, destaca-se o *Plectranthus barbatus* devido ao seu amplo cultivo no Brasil e pelo difundido uso de suas folhas no tratamento de problemas digestivos. *Plectranthus barbatus*, também conhecida como malva-santa, falso-boldo, boldo-brasileiro, boldo-do-reino, é uma planta subarborescente, aromática e perene, com poucos ramos, com até 1,5m de altura, com folhas ovais alongadas e de sabor muito amargo. Dentre seus constituintes fitoquímicos merecem destaque os metabólitos secundários como os diterpenos, inclusive alguns que apresentam importância farmacológica como a barbatusina, ciclobarbatusina, barbatusol, plectrina, carioal, plectrinona, entre outros⁽⁷⁾.

Segundo Teixeira et al. (2003)⁽⁹⁾ e Fachinetto et al. (2007)⁽¹⁰⁾, o sistema vegetal *Allium cepa*, tem sido utilizado com sucesso na obtenção de genotoxicidade dos extratos de várias plantas de uso medicinal. O teste com este sistema vegetal permite utilizar diferentes concentrações do extrato da planta em pesquisa, as alterações cromossômicas e as divisões das células meristemáticas das raízes da cebola, são usadas com bastante frequência com o objetivo de advertir a população sobre o consumo de determinado produto⁽¹¹⁾.

Para avaliar e prevenir a presença de agentes genotóxicos é necessário utilizar indicadores sensíveis que permitam detectar a ação desses compostos. Existem plantas que são consideradas ideais para o estudo de mutagênese, tanto em laboratório quanto em monitoramento *in situ*, atuando assim, como "bioindicadoras"⁽¹²⁾. Para isto, foram desenvolvidos diversos ensaios que possibilitam essa avaliação, um deles é o teste vegetal *Allium cepa*, utilizado como um bioindicador de genotoxicidade em extratos de plantas medicinais⁽¹³⁾.

Diante do exposto, os ensaios científicos com o intuito de avaliar a possível citotoxicidade e genotoxicidade de *Plectranthus barbatus*, faz-se necessário, pois trata-se de uma planta medicinal largamente utilizada no país e que ainda não apresenta todas as suas propriedades e mecanismos tóxicos totalmente elucidados.

Objetivou-se neste experimento avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações do infuso de folhas de *Plectranthus barbatus* através do sistema vegetal *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODO

As folhas de malva-santa (*Plectranthus barbatus*) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais no Centro de Saúde da Família do Sumaré (Sobral/CE). Os bulbos de *Allium cepa* foram obtidos em redes de supermercados da cidade, todos de mesma procedência, de aparência saudável e não germinadas. O extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* foi preparado como infusão, a partir de folhas frescas.

As bases dos bulbos (prato) das cebolas (*Allium cepa*) foram colocadas em contato direto com a infusão em recipientes a temperatura ambiente para enraizar. As capas mais externas e as raízes envelhecidas ou secas do bulbo foram retiradas para evitar o apodrecimento.

O primeiro tratamento (T1) da infusão de malva-santa foi baseada em uma dose usual, obtida na literatura, que é de 6g de folhas frescas em 250mL de água fervente(14); o segundo (T2), 12g de folhas frescas em 250mL de água fervente; e o terceiro (T3), com 18g de folhas frescas colocadas em 250mL de água fervente. O quarto tratamento (T4) foi o controle negativo que constou água mineral e para o controle positivo no quinto tratamento (T5) foi utilizado o paracetamol a 800mg/L.

Após o período de crescimento das raízes, as cebolas foram retiradas para se fazer a medição do comprimento com auxílio de uma régua. Imediatamente após a coleta as raízes foram fixadas em solução fixadora de Carnoy (etanol 95% + ácido acético glacial na proporção de 3:1 v/v) por período de 24 horas a temperatura ambiente⁽¹⁵⁾. As raízes foram lavadas três vezes com água destilada por cinco minutos. Em seguida, com auxílio de pinça e bisturi, foram retiradas os ápices radiculares com cerca de 1 mm, de cada raiz em cada tratamento (já fixadas) e foram fragmentados o máximo possível com bisturi.

Os fragmentos obtidos foram colocados em lâmina para coloração. Foi adicionado a esses fragmentos duas gotas de hematoxilina de Harris a 1%, colocado a lamínula por cima, envolvidas em papel toalha para retirar o excesso do corante e esmagadas com polegar. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, em objetiva de 40X(16). Para cada tratamento foram utilizados três bulbos. Para cada bulbo foi confeccionada uma lâmina. Em cada lâmina foram colocadas de seis a oito ápices radiculares. Foram feitas oito focagens de 50 células, totalizando 400 células por lâmina, com três lâminas para cada tratamento, totalizando 1.200 células analisadas por tratamento.

Para a análise dos efeitos tóxicos foram medidos os comprimentos das raízes, somados os resultados e calculado as médias simples. Para os efeitos citotóxicos, foram verificados os índices mitóticos (IM) de cada tratamento, os quais foram somadas as células em qualquer fase de divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase), dividindo-se pelo total de células contadas e multiplicando-se por 100⁽¹⁷⁾.

Para a análise dos efeitos genotóxicos foram observados todos os tipos de aberrações cromossômicas encontradas. Já para a avaliação dos efeitos mutagênicos foram registradas a ocorrência de micronúcleos.

As variáveis analisadas foram: comprimento radicular (cm), o índice mitótico (IM), as anomalias do ciclo mitótico (ACM), como cromossomos perdidos e pontes anafásicas, aberrações cromossômicas (AC's) e as anomalias interfásicas (AI), como células com micronúcleos, células binucleadas, células com núcleos ligados e brotos nucleares⁽¹⁸⁾.

Para a análise de AC's foram considerados: cromossomos soltos e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos, sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC's⁽¹⁹⁾.

As médias obtidas dos diferentes tratamentos, para as variáveis analisadas, foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram feitas através de análise de variância de uma via (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 nos revela os resultados do teste de toxicidade sobre *Allium cepa* quando tratado com diferentes concentrações do infuso de malva-santa.

Tabela 1. Valores das médias do crescimento radicular de *A. cepa* submetidas à diferentes infusões de *Plectranthus barbatus*.

	Tratamentos				
	CN	T1	T2	T3	CP
Comprimento radicular (cm)	2,5 a	0,82 b	0,58 cd	0,71 bc	0,38 d

CN: controle negativo; CP: controle positivo. Médias seguidas de letras iguais indicam que no nível de 5% significância, não há diferença entre as médias. DV: 0,08.

A toxicidade de *Plectranthus barbatus* sobre as raízes de *Allium cepa* foi notória neste trabalho. As raízes de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações da infusão de *Plectranthus barbatus* tiveram o desenvolvimento de suas raízes comparadas aos controles. A infusão apresentou toxicidade sobre o sistema vegetal *Allium cepa* em todos os tratamentos, pela inibição de meristemas de raízes. Ficou evidente a inibição do crescimento radicular da cebola, à medida que aumentava a concentração da infusão, como pode ser observado na Tabela 1. Os tratamentos e o controle positivo apresentaram diferenças estatísticas relevantes em comparação com o controle negativo.

Fachinetto et al. (2007)⁽¹⁰⁾ observaram a ação antiproliferativa sobre o ciclo celular da cebola com infusões de macela (*Achyrocline satureioides* DC), sendo que a ação inibitória da divisão celular aumentou conforme o aumento das concentrações das infusões. O crescimento de raízes pode ser regulado pela combinação entre atividades de divisão celular em meristemas mitoticamente ativos e com a alongação celular que acontece nas regiões proximais dos ápices das raízes⁽²⁰⁾. Assim, todas as concentrações causaram distúrbios de proliferação em meristemas de *Allium cepa*. Esses dados corroboram com os relatos sobre a importância do teste *Allium cepa*, especialmente por permitir análises macroscópicas e microscópicas, bem como pelas boas correlações com testes em mamíferos⁽⁹⁾.

O teste que avalia a germinação dos vegetais é um modelo amplamente utilizado para avaliar o potencial aleloquímico de extrato da planta ou de substâncias. Comparando os resultados obtidos com os encontrados por Fiskesjö (1985)⁽²¹⁾, pioneiro nesse sistema teste vegetal, conclui-se que a infusão de malva-santa possui, nas concentrações testadas, ação tóxica e/ou citotóxica sobre as raízes de *Allium cepa*. Munhoz e César (2014)⁽²²⁾ ao avaliarem a inibição do crescimento radicular de *Allium cepa* exposta a infusões de chá verde (*Camellia sinensis*), também obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho.

A Tabela 2 mostra o número total de células analisadas, assim como, de cada fase da mitose, avaliando, dessa forma, o efeito citotóxico sobre *Allium cepa*.

Tabela 2. Número de células no ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) em meristemas de raízes *A. cepa* tratadas com o infuso de *Plectranthus barbatus*.

	Tratamentos				
	CN	T1	T2	T3	CP
Total de células	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200
Interfase	974	1.094	1.117	1.150	1.170
Prófase	196	94	72	42	30
Metáfase	11	05	03	01	00
Anáfase	09	03	01	02	00
Telófase	10	04	07	05	00
Total de mitoses	226 a	106 b	83 bc	50 cd	30 d

CN: controle negativo; CP: controle positivo. Médias seguidas de letras iguais indicam que no nível de 5% significância, não há diferença entre as médias. DV: 4,25.

Conforme os dados da Tabela 2, verifica-se uma diminuição significativa no número de mitoses observadas nos tratamentos à medida que houve o aumento na concentração das infusões. Fica caracterizada que a infusão de malva-santa é citotóxica sobre as raízes de *Allium cepa* em todas as concentrações testadas. Na análise estatística é visto diferenças estatisticamente significativas dos tratamentos e do controle positivo em relação ao controle negativo.

O índice mitótico (IM), apresentado na Tabela 3, corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem. O índice mitótico diferiu significativamente do controle negativo em água de 18% para 8% no primeiro tratamento da infusão de malva-santa. Os tratamentos T2 e T3 não obtiveram diferenças significativas entre suas médias, mas em relação ao controle negativo, os dois tratamentos apresentaram uma redução do índice mitótico bastante importante. A redução do índice mitótico também foi significativa entre os dois controles, água pura sem cloro (negativo) e paracetamol 800mg/L (positivo).

Para os resultados de citotoxicidade (Tabela 3), foi observado que houve uma queda dos índices mitóticos para todos os tratamentos, em relação ao índice do controle negativo, cujos valores foram, de maneira geral, diferentes estatisticamente do teste controle. A inibição da divisão celular observada através dos valores dos índices mitóticos em *Plectranthus barbatus* demonstra que esta planta medicinal possui capacidade antiproliferativa. Bagatini et al. (2009)⁽²³⁾, realizaram estudos com *Solidago microglossa* (erva-lanceta) e demonstraram que essa espécie, na maior concentração estudada, causou uma redução no índice mitótico comparado com o controle negativo.

Tabela 3. Valor do índice mitótico em meristemas de raízes de *A. cepa* tratadas com o infuso de *Plectranthus barbatus*.

	Tratamentos				
	CN	T1	T2	T3	CP
% Índice Mitótico	18 a	08 b	06 bc	04 bc	02 d

CN: controle negativo; CP: controle positivo. Médias seguidas de letras iguais indicam que no nível de 5% significância, não há diferença entre as médias. DV: 0,59.

Knoll et al. (2006)⁽²⁴⁾ obtiveram resultados similares ao deste trabalho, no qual demonstravam a atividade antiproliferativa de *Pterocaulon polystachyum* (quitoco), planta com propriedade amebicida, onde observaram que os índices mitóticos em uma das populações estudadas foram reduzidos de 7,5% a 0,03%. Os índices mitóticos encontrados para as infusões de macela (*Achyrocline satureioides* DC), e infalivina (*Artemisia verlotorum*) respectivamente, também apresentaram diminuição significativa quando comparados com o controle negativo em água^(10, 25). Para Hoshina (2002)⁽²⁶⁾, um decréscimo acentuado no índice mitótico é indicador de citotoxicidade da substância, já um aumento indica indução da divisão celular, o que pode induzir ao aparecimento de tumorização nos seres vivos. No trabalho em questão ocorreu um decréscimo significativo nos índices mitóticos.

Na Tabela 4 foram quantificadas as alterações cromossômicas durante a divisão celular das raízes da cebola tratadas com malva-santa.

Tabela 4. Número de aberrações cromossômica em meristemas de raízes de *A. cepa* tratadas com o infuso de *Plectranthus barbatus*.

Aberrações	Tratamentos				
	CN	T1	T2	T3	CP
Anáfase Irregular	00	02	01	02	00
Cromossomos soltos	00	02	08	15	00
Micronúcleos	00	00	03	04	06

continua...

Tratamentos					
Célula binucleada	00	01	01	00	00
Metáfase desorganizada	00	00	01	00	00
Prófase desorganizada	00	00	01	00	00
Total	00 c	05 bc	15 ab	21 a	06 bc

CN: controle negativo; CP: controle positivo. Médias seguidas de letras iguais indicam que no nível de 5% significância, não há diferença entre as médias. DV: 1,32.

O tratamento T3, com a maior concentração do infuso de *Plectranthus barbatus* (18g de folhas) apresentou um índice de aberrações cromossômicas significante em relação ao controle negativo, aos outros tratamentos e ao controle positivo (paracetamol 800 mg/L). O tratamento T2 (12g de folhas) apresentou uma média de aberrações cromossômicas com importante relevância, demonstrando que neste tratamento também há a ocorrência de efeito genotóxico. Portanto, pode-se inferir que o infuso de malva-santa induziu em pelo menos dois tratamentos (T2 e T3), uma considerável taxa de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*, demonstrando assim, efeito genotóxico.

Vários trabalhos científicos comprovam a utilização do teste de *Allium cepa* como um ensaio importante na avaliação de genotoxicidade de extratos e infusões de plantas medicinais^(13,10). Dalla Nora et al. (2010)⁽²⁷⁾ e Souza et al. (2010)⁽²⁵⁾ também encontraram atividade genotóxica pelo teste de *Allium cepa* em extratos de *Psychotria myriantha*, *Mikania glomerata* e *Artemisia verlotorum*, respectivamente. Os agentes mutagênicos podem ser detectados, citologicamente pela inibição do ciclo celular, interrupção em metáfases, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de trocas entre cromátides irmãs entre outros⁽²⁸⁾.

Segundo Silva et al. (2003)⁽³⁰⁾, a análise de alterações cromossômicas serve como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos potenciais.

CONSIDERAÇÕES

Através da análise dos resultados das diferentes concentrações de *Plectranthus barbatus* sobre o ciclo celular do sistema vegetal *Allium cepa*, foi possível verificar e comprovar a atividade tóxica e citotóxica pela significativa inibição do comprimento das raízes e inibição do ciclo celular das raízes, caracterizando a atividade antiproliferativa.

Na avaliação genotóxica, pelos menos duas concentrações do infuso mostraram-se como indutora de genotoxicidade através do aumento da frequência de aberrações cromossômicas, o que evidencia que as duas maiores concentrações testadas do infuso de malva-santa, em seu uso crônico, podem sim, causar danos ao DNA celular.

O presente estudo revelou mais uma constatação, que as plantas medicinais não estão livres de efeitos ou reações indesejáveis, pois precisam ser consumidas com cautela e seguindo o que preconiza a literatura. O uso racional das drogas vegetais é uma ação que precisa ser mais bem esclarecida para a população, além de necessitarem de mais e melhores estudos que comprovem suas características farmacológicas ou não, bem como seus possíveis males à saúde dos usuários. Dado que determinadas plantas medicinais largamente utilizadas pela população, já apresentaram, em algumas concentrações, efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos como a droga vegetal neste presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
2. Anibal PC. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2007.
3. Pinto AC, Veiga Júnior, VF, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, 2005; 28 (3): 519-528.
4. Santos MRA, Lima MR, Ferreira MG. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, RO. Horticultura Brasileira, 2008; 26 (2): 244–250.
5. Calixto JB. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. Journal of Ethnopharmacology, 2005; 100 (1-2): 131-134.
6. Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética toxicológica. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003.
7. Matos FJA. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002.
8. Albuquerque RL. Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: *Plecthanthus barbatus* Andr. *Plecthanthus amboinicus* (Lour) Spreng. 2000. 166 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
9. Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. Genetics and Molecular Biology, 2003; 26 (4): 551-555.
10. Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Rev Bras de Farmacognosia, 2007; 17 (1): 49-54.
11. Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.; medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. Acta Scientiarum, 2001; 23 (2): 593-598.
12. Guimarães IB, Alves ES, Caldini Júnior N, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Saldiva PHN. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleous (Trad-MCN) assay. Environmental and Experimental Botany, 2000; 44 (1): 1-8.
13. Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Rev. Bras. de Farmacognosia, 2007; 17 (3): 444-447.
14. Matos FJA. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária/Edições UFC, 2007.
15. Sharma AK, Sharma A. Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999.
16. Guerra M, Souza MJ. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: Funpec, 2002.
17. Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Pereira Filho IA, Magalhães PC. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. Rev. Bras. Fisiol. Veg., 2001; 13 (1): 55-65

18. Sturbelle, Pinho DS, Estani RG, Oliveira GR, Garcias GL, Martino-Roth MG. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica de *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócito humanos binucleados. Rev. Bras. de Farmacognosia, 2010; 20 (3): 409-415.
19. Lucio Neto MP. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2, 4-diona em células eucariotas. 2011. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, 2011.
20. Shishkova S, Rost TL, Dubrovsky JG. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. Annals of Botany, 2008; 101: 319-340.
21. Fachineto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Rev. Bras. de Farmacognosia, 2008; 17 (1): 49-54.
22. Fiskejö G. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring. Hereditas, 1985; 102 (1): 99-112.
23. Munhoz MGL, César ACG. Inibição do crescimento radicular de *Allium cepa* exposta a infusões de chá verde (*Camellia sinensis*). 5º Congresso Científico da Semana Tecnológica – IFSP:Bragança Paulista -SP, 2014.
24. Bagatini MD, Fachineto JM, Silva ACF, Tedesco SB. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. Rev Bras de Farmacognosia, 2009; 19 (2B): 632-636.
25. Knoll MF, Silva ACF, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. Genetics and Molecular Biology, 2006; 29 (1): 539-542.
26. Souza LFB, IV HDL, Pastori T, Tedesco M, Kuhn AW, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. International Journal of Environmental Studies, 2010; 67 (6): 871-877.
27. Hoshina MM. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à Bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*. 2002. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São Paulo, 2002.
28. Dalla Nora G, Pastori T, IV HDL, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikaniaglomerata* (Asteraceae). Biocell, 2010; 34 (3): 95-101.
29. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research, 2009; 682 (1): 71-81.
30. Silva J, Heuser V, Andrade V. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003.