

Prospecção fitoquímica e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock

Phytochemical screening and evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock

Tamizaje fitoquímico y evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock

MSc. Josivany V. de Freitas,^I Dra. C. Maria do Carmo P. Batitucci,^I Dra. C. Marciene A. Andrade,^{II} Lic. Fernando de Souza Santos, MSc. Anny Carolyne da Luz,^I Lic. Urraca J. A. Pereira^I

^I Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, Departamento de Ciências Biológicas. Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo. Brasil.

^{II} Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará. Brasil.

RESUMO

Introdução: *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock é uma planta pertencente à família Asteraceae cujo nome popular é camomila amarela e tem sido utilizada como calmante, estimulante, digestivo, tratamento de náuseas, inflamações das vias urinárias e no combate a febres e afecções de pele.

Objetivos: realizar a prospecção fitoquímica e avaliar os potenciais efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do extrato bruto hidroalcoólico de *Helenium amarum*, através do teste com *Allium cepa*.

Métodos: sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação em quatro concentrações (0,6; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/mL) do extrato bruto de folhas de *Helenium amarum*, submetidas à secagem em estufa, por 5 dias e, posteriormente, pulverizadas e maceradas em etanol 70 %, à temperatura ambiente, por 72 h. Após esse período, o extrato foi filtrado e a fase líquida foi submetida à rotaevaporação. Foram realizados dois tipos de tratamento: 1) Tratamento contínuo: as sementes foram germinadas diretamente nos extratos nas diferentes concentrações. 2) Tratamento descontínuo: as sementes foram inicialmente germinadas em água Milli-Q até suas radículas atingirem cerca de 2 cm de comprimento, sendo posteriormente expostas às diferentes concentrações do extrato.

Resultados: o índice de germinação foi diretamente afetado pelas concentrações do extrato, sendo menor que o controle negativo em todos os tratamentos. O Índice mitótico, para todas as concentrações, foi menor do que os controles, em ambos os tratamentos. No tratamento descontínuo, o índice de efeitos aneugênicos para as concentrações testadas foi menor que para os controles, já o índice de efeitos clastogênicos foi 1 % para o controle negativo e tratamentos de 1 e 3 mg/mL, abaixo de 1 % para os tratamentos de 0,6 e 2,0 mg/mL e 20 % para o controle positivo. A prospecção fitoquímica indicou resultados positivos para tanino, esteroides e triterpenoides.

Conclusões: *Helenium amarum* apresenta efeitos tóxicos e citotóxicos, ação alelopática e não apresentou efeitos genotóxicos nas concentrações testadas.

Palavras chave: *Helenium amarum*, *Allium cepa*, citotoxicidade, genotoxicidade, prospecção fitoquímica.

ABSTRACT

Introduction: *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock is a plant of the family Asteraceae. Its common name is yellow camomile. It is used as tranquilizer, stimulant and digestive, and for the treatment of nausea, fever and skin disorders.

Objectives: carry out a phytochemical screening and evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of a crude hydroalcoholic extract of *Helenium amarum* using the *Allium cepa* test.

Methods: seeds of *Allium cepa* were subjected to germination at four concentrations (0.6, 1.0, 2.0 and 3.0 mg/mL) of *H. amarum* crude leaf extract. After being dried in an oven for 5 days, they were pulverized and macerated in 70 % ethanol at room temperature for 72 hours. The extract was then filtered and the liquid phase subjected to a rotary evaporator. Two sorts of treatment were applied: 1) continuous treatment: the seeds were germinated directly in the extract at different concentrations. 2) intermittent treatment: the seeds were first germinated in Milli-Q water until they grew 2 cm long rootlets, and were then exposed to different extract concentrations.

Results: the germination rate was affected by extract concentration, and was lower than that of the negative control in all treatments. The mitotic index for all concentrations was lower than that of controls for both treatments. In batch processing, the aneugenic effects index at the assayed concentrations was lower than that of controls, whereas the clastogenic index was 1 % for the control and treatments 1 and 3 mg/mL, lower than 1 % for treatments 0.6 and 2 mg/mL, and 20 % for the positive control. Phytochemical screening showed positive results for tannins and steroids.

Conclusions: *Helenium amarum* has toxic and cytotoxic effects and allelopathic action, but not genotoxic effects at the assayed concentrations.

Key words: *Helenium amarum*, *Allium cepa*, cytotoxicity, genotoxicity, phytochemical prospectation.

RESUMEN

Introducción: *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, su nombre común es manzanilla amarilla. Es utilizada como tranquilizante, estimulante y digestivo; en el tratamiento de náuseas, para combatir la fiebre y en afecciones de la piel.

Objetivos: realizar tamizaje fitoquímico y evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de un extracto crudo hidroalcohólico *Helenium amarum* a través de la prueba de *Allium cepa*.

Métodos: semillas de *Allium cepa* fueron sometidas a germinación en cuatro concentraciones (0,6, 1,0, 2,0 y 3,0 mg/mL) del extracto bruto de hojas de *H. amarum*, se secaron en horno durante 5 días, se pulverizaron y maceraron en etanol al 70 % a temperatura ambiente durante 72 h. Luego el extracto se filtró y la fase líquida se sometió a un evaporador rotatorio. Se aplicaron dos tipos de tratamiento: 1) tratamiento continuo: las semillas fueron germinadas directamente en el extracto a diferentes concentraciones. 2) Tratamiento intermitente: las semillas se germinaron primero en agua Milli-Q hasta que alcanzaron raicillas de 2 cm de largo; luego se expusieron a diferentes concentraciones del extracto.

Resultados: la tasa de germinación fue afectada por las concentraciones del extracto siendo menor que la del control negativo en todos los tratamientos. El índice mitótico para todas las concentraciones fue más bajo que los controles para ambos tratamientos. En el procesamiento por lotes, el índice de efectos aneugénico a las concentraciones ensayadas fue menor que para los controles, siendo el índice clastogénico 1 % para control y los tratamientos 1 y 3 mg/mL, por debajo de 1 % para los tratamientos 0,6 y 2 mg/mL y 20 % para el control positivo. El tamizaje fitoquímico mostró resultados positivos para los taninos, y esteroides.

Conclusiones: *Helenium amarum* presenta efectos tóxicos y citotóxicos, acción alelopática y no efectos genotóxicos en las concentraciones ensayadas.

Palabras clave: *Helenium amarum*, *Allium cepa*, citotoxicidad, genotoxicidad, fitoquímicos.

INTRODUÇÃO

Helenium cf. amarum (Raf.) H. Rock, popularmente conhecida como camomila amarela, é uma espécie herbácea anual, predominantemente americana e parece preferir regiões áridas. Pertence a uma tribo das Asteraceae, uma família com grande ocorrência de lactonas sesquiterpênicas, as quais podem ser responsáveis por eventuais ações tóxicas. Sua inflorescência, toda amarela, é aromática e muito amarga ao paladar.¹

Há o relato do emprego de uma espécie de camomila amarela como calmante, estimulante, digestivo, tratamento de náuseas, inflamações das vias urinárias e no combate a febres e afeções de pele.² Relatos de reações alérgicas à camomila são comuns, embora na maioria dos casos a espécie não seja identificada.¹

O uso de plantas medicinais e seus produtos pode tornar-se um problema, pois algumas das substâncias que as compõem podem desencadear efeitos deletérios que resultam em um quadro clínico severo, algumas vezes, fatal.³ Assim, a aplicação de testes de avaliação de possíveis efeitos tóxicos, genotóxicos e citotóxicos é extremamente importante, e estes devem ser realizados quando da avaliação fármaco-fisiológica de extratos vegetais, para que ao serem utilizados como medicamento, esses não causem danos ao organismo humano.

O teste de *Allium cepa* tem sido bastante utilizado e é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais.⁴ Esse teste apresenta boa correlação com outros sistemas de teste, sendo assim, resultados positivos no teste de *Allium cepa* devem ser considerados como um alerta e também um indicativo de que o fator químico testado pode ser um risco para a saúde do homem.^{5,6}

Neste trabalho realizou-se a prospecção fitoquímica dos ramos de *Helenium amarum*, a fim de caracterizar as principais classes de metabólitos secundários, bem como a investigação dos potenciais efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *Helenium amarum*, proveniente de sua utilização, por meio da análise no sistema-teste de *Allium cepa* (cebola).

MÉTODOS

Coleta e Preparo do Material Vegetal

As plantas da espécie *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock (Asteraceae) foram coletadas no Parque Municipal de Tabuazeiro, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

As exsiccatas do material botânico foram depositadas no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (Vitória, ES, Brasil) sob nº 14.013.

Obtenção do Extrato

Folhas do vegetal foram submetidas à secagem em estufa, com circulação de ar, à 40 °C, por aproximadamente 5 dias, sendo posteriormente pulverizadas.

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, 60g do pó da planta foram diluídos em 700 mL de etanol 70 %, à temperatura ambiente, por 72 horas. Após esse período, foi realizada a filtração a vácuo dos extratos em rota-evaporador a pressão reduzida e temperatura de 60 °C, com a finalidade de remover o solvente, sem alteração dos componentes químicos dos extratos. Ao final, o extrato bruto foi colocado em vidro âmbar e mantido em geladeira até o momento da realização do protocolo experimental onde os referidos extratos foram dissolvidos em água destilada, com auxílio de Cremofor, para obtenção das frações aquosas. A massa seca do extrato foi estabelecida por meio de desidratação em aquecedor.

Teste *Allium cepa*

Sementes de *Allium cepa* (*Baia periforme*) foram submetidas à germinação em quatro concentrações do extrato de *Helenium amarum* (0,6 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL). Os controles, negativo (CN) e positivo (CP) foram realizados

com sementes submetidas à germinação em água Milli-Q e Metil Metano Sulfonado (MMS), respectivamente. Foram realizados dois tipos de tratamento:

1) Tratamento contínuo: as sementes (n= 50) foram germinadas diretamente nos extratos nas diferentes concentrações.

2) Tratamento descontínuo: as sementes (n= 50) foram inicialmente germinadas em água Milli-Q até suas radículas atingirem cerca de 2 cm de comprimento, sendo posteriormente expostas às diferentes concentrações do extrato, por um período de 72 h (tratamento crônico). Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy 3: 1, por 24 h.

A confecção das lâminas foi realizada segundo Fiskejő (1985).⁵

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz (LEICA, DM/LS), com objetiva de aumento de 40X. Foram analisadas 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células por grupo.

Para análise do efeito tóxico, foi analisado o número de sementes germinadas nas diferentes concentrações do extrato em comparação com o controle negativo, bem como parâmetros macroscópicos como comprimento e morfologia das raízes.

Para avaliação de possíveis efeitos citotóxicos analisou-se o índice mitótico obtido pela avaliação do número de células em divisão celular, pela seguinte **fórmula**:

Os efeitos clastogênicos e aneugênicos foram avaliados pela frequência de células aberrantes presentes no material genético de *Allium cepa* através da **fórmula**:

Todos os resultados foram analisados utilizando-se o Teste do Qui-Quadrado, com níveis de significância para $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Prospecção Fitoquímica

A análise fitoquímica foi realizada utilizando-se alíquotas do extrato bruto para detecção dos seguintes grupos de metabólitos secundários: antocianos, saponinas, depsídeos/depsidonas, fenóis, flavonoides, catequinas, taninos, antraquinonas, proteínas, polissacarídeos, saponinas espumídicas, açúcares redutores, cumarinas, alcaloides e triterpenos/esteroides.

Foram realizados ensaios de complexação com a gelatina, reação com acetato de cobre e com cloreto férrico.

RESULTADOS

Teste *Allium cepa*

O índice de germinação foi diretamente afetado pela concentração do extrato, pois em todos os tratamentos esse índice foi menor que o encontrado no controle negativo (Fig.).

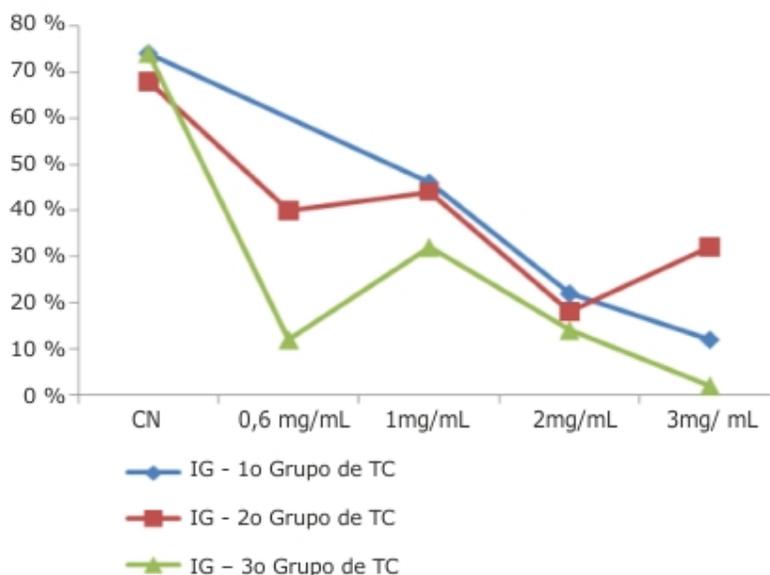


Fig. Índice de Germinação (IG) para o 1º, 2º e 3º Grupos de Tratamentos Contínuo (TC).

Foi observada uma diferença significativa entre o tamanho das raízes germinadas em presença das diferentes concentrações do extrato em relação ao tratamento controle negativo (tabela 1). Já com relação à coloração e textura das raízes, para todos os tratamentos, não foram observadas diferenças relevantes.

O índice mitótico (IM) das diferentes concentrações testadas foi menor do que o IM do controle negativo, nos tratamentos contínuo e descontínuo (tabela 2).

O índice de efeitos aneugênicos (IEA) das concentrações de extrato testadas apresentaram-se abaixo de 1 %, no tratamento descontínuo.

O índice de efeito clastogênico observado no tratamento descontínuo foi de 1 % para o controle negativo e para os tratamentos de 1 e 3 mg/mL e abaixo de 1 % para os tratamentos de 0,6 e 2,0 mg/mL.

Tabela 1. Comprimento mínimo e máximo (mm) das raízes de *A. cepa* germinadas em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Helenium amarum* e em água mili-Q (CN)

Concentrações (mg/mL)	Comprimento Mínimo (mm)	Comprimento Máximo (mm)
Controle Negativo (CN)	20	50
0,6	2 **	5 **
1,0	3 **	10 **
2,0	2 **	4 **
3,0	2 **	5 **

Teste do Qui-quadrado: (**) diferenças significativas $p < 0,01$

Tabela 2. Índices mitóticos (%) dos meristemas de *A. cepa* submetidos ao controle negativo (CN), positivo (CP) e diferentes concentrações de *Helenium amarum*

Concentrações (mg/mL)	Tratamento Contínuo	Tratamento Descontínuo
CN	8 %	17 %
0,6	0 %	2 %
1,0	0 %	6 %
2,0	1 %	0 %
3,0	0 %	2 %
CP	-	22 %

Prospecção Fitoquímica

Os ensaios realizados com os extratos hexânico, dicloro metânico e etanólico apresentaram resultados positivos à presença de tanino, no entanto, a reação do extrato hexânico com cloreto férrico apresentou resultado negativo à presença desse composto.

Os resultados sugerem forte presença de taninos, exceto no extrato com alto teor lipofílico, ou seja, o extrato hexânico (tabela 3).

A reação de Shinoda e a reação com Hidróxido de sódio 1N apresentaram resultados fracamente positivos. Os ramos apresentaram resultado negativo quanto à presença de antraquinonas e de catequinas e, quanto à presença de esteroides e triterpenoides (reação de Lieberman - Burchard), apresentaram resultados de fracos a intermediários (tabela 4).

Tabla 3. Análise de taninos presentes nos extratos em hexano, diclometano e etanol de ramos de *Helenium amarum*

Extratos	Reagentes		
	Gelatina (proteína)	Sulfato de Cobre	Cloreto Férrico
Hexano	+++	+++	-
Diclorometano	+++	+++	+++
Etanol	+++	+++	+++

+++ = Reação positiva, ++ = Reação intermediária, + = Reação fraca, - = Reação negativa.

Tabela 4. Análise de esteróides e triterpenóides nos extratos em hexano, diclorometano e etanol dos ramos de *Helenium amarum*

Extratos	Resultado
Hexano	++
Diclorometano	++
Etanol	+

+++ = Reação positiva, ++ = Reação intermediária, + = Reação fraca, - = Reação negativa

Determinação da polaridade do extrato

Após a análise das placas provenientes da cromatografia em camada delgada, notou-se que o extrato que continha uma maior quantidade de compostos era o diclorometânico e que este apresentou uma melhor corrida cromatográfica na faixa polar caracterizando assim este extrato como um potencial alvo de estudos futuros.

DISCUSSÃO

A ação aleloquímica de extratos tem sido investigada em vários estudos, sendo os metabólitos secundários das plantas apontados como os principais responsáveis por essa ação.^{10,11} Na avaliação da alelopatia de extratos, um dos parâmetros analisados é a germinação das sementes que, apesar de ser menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, sua quantificação é muito mais simples.¹⁰ Considerando os valores de índice de germinação apresentados na figura, observou-se uma inibição significativa na germinação das sementes de *Allium cepa* à medida que a dose do extrato aumentou, caracterizando-se como um possível efeito alelopático negativo. Estudo de Haida e colaboradores também indicam que extratos vegetais podem produzir efeitos alelopáticos negativos, como os de *Achillea millefolium* L. que tiveram esse efeito sobre sementes de *Lactuca sativa* L.⁷ Outro estudo feito por Silva e colaboradores, indicou efeito alelopático negativo do extrato alcoólico de *Piper hispidinervum* C. DC sobre a germinação de sementes *Lactuca sativa*.¹⁰

A emergência da plântula e seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese do indivíduo, portanto apenas a avaliação da germinação não é suficiente para se considerar um extrato ou metabólito com ação alelopática, sendo interessante também a avaliação do comprimento da radícula no estabelecimento dessa ação ou mesmo da toxicidade de um extrato.¹¹

Vários mecanismos de ação são propostos para os aleloquímicos, dentre eles as alterações na membrana são consideradas ações diretas desses agentes sobre a célula do vegetal em questão.¹¹ Em relação à coloração e textura das raízes não foram observadas diferenças significativas, o que sugere que as substâncias

presentes no extrato de *Helenium amarum* não tiveram a sua ação alelopática determinada pela alteração na permeabilidade celular.

A citotoxicidade de determinada substância pode ser estabelecida pelo aumento ou diminuição de índice mitótico.^{12,13} A divisão mitótica é um evento sensível à interferência de fatores ambientais externos.¹⁴ A análise dos índices mitóticos das raízes submetidas aos tratamentos (contínuo e descontínuo) foram utilizadas como parâmetros de citotoxicidade.

Índices mitóticos superiores aos observados no controle negativo mostram que houve uma indução da divisão celular. Essa situação pode ser prejudicial às células, pois pode levar ao aparecimento de tumorização nos seres vivos.¹⁵ Já os índices mitóticos inferiores aos apresentados pelo controle negativo podem comprometer o crescimento e o desenvolvimento dos organismos submetidos aos agentes causadores.¹⁶

Alterações no material genético induzidas por administração de extratos vegetais, exposição a agentes físicos ou químicos diversos são de importância não só para os procedimentos de validação de fitoterápicos, mas também para o entendimento dos mecanismos de ação desses mutágenos e auxílio nas medidas de prevenção ao câncer. Dentre os efeitos observados por diferentes drogas podemos considerar os efeitos aneugênicos e clastogênicos, os quais são ocasionados, respectivamente, por alterações no fuso mitótico e na estrutura dos cromossomos.¹² No tratamento contínuo não foram observados efeitos clastogênicos ou aneugênicos, uma vez que não havia um número significativo de células em divisão, e aquelas que foram observadas encontravam-se, na sua maioria, em intérfase ou apoptose. No tratamento descontínuo observou-se que não houve diferença significativa das concentrações testadas, em relação aos controles positivo e negativo, o que demonstra a não genotoxicidade desse extrato.

A análise fitoquímica detectou a presença de constituintes químicos de importância farmacológica, os quais podem reter alguma toxicidade associada à inibição da germinação das raízes de *A. cepa* e às alterações no seu crescimento. Os relatos em estudos anteriores da presença de alcalóides e de lactonas sesquiterpênicas, em *Helenium amarum*, constituem um dado importante, visto que esses são compostos químicos que possuem toxicidade e podem também estar associados aos efeitos danosos deste extrato.^{17,18} A polaridade do extrato frente ao diclorometano indica que estudos utilizando-se esse solvente poderão promover uma melhor extração de seus compostos e, percebe-se, a partir dos resultados, a necessidade de estudos posteriores, mais específicos, na demonstração dos mecanismos que levam à toxicidade desta planta, caracterizando melhor aqueles compostos responsáveis por seus efeitos danosos. Considerando-se o uso da espécie *Helenium amarum* pela medicina tradicional, o presente estudo apresentou efeitos negativos nos bioensaios realizados, servindo como alerta para a utilização indiscriminada dessa espécie e de qualquer planta sem um estudo adequado de toxicidade e mutagenicidade.

APOLO FINANCIERO

FAPES – Fundação de amparo à Pesquisa do Espírito Santo.

REFERÊNCIAS

1. Recco CRN. Caracterização morfo-histológica e fitoquímica de *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock (Asteraceae) em comparação com *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), espécies de camomilas utilizadas na fitoterapia, Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Vitória, 2005; 60 p.
2. Martins E, Castro D, Castellani D, Dias J. Plantas Mediciniais. Universidade Federal de Viçosa: Imprensa Universitária; 1995, p. 55-58.
3. Pinho DS, Sturbelle RT, Martino-Roth MG, Garcias GL. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010;20(2):165-170.
4. Cabrera GL, Rodriguez DM. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with waste water using three plant bioassays. Mutation Research. 1999;426(2):211-4.
5. Fiskejõ G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. Hereditas. 1985;102(1):99-112.
6. Dias NS, Silva TC, Filho GPB, Badreddine JF, Matozinho HHS, Resende MR, et al. Estudo dos efeitos mutagênicos e citotóxicos do confrei (*Symphytum Officinale*) no ciclo celular de *Allium cepa*. Revista Eletrônica de Farmácia. 2013;10(3):20-29.
7. Haida KS, Coelho SRM, Costa JH, Vicelli CA, Alekcevetch JC, Barth EF. Efeito alelopático de *Achillea millefolium* L. sobre sementes de *Lactuca saliva* L. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. 2010;3(1):101-109.
8. Silva CB, Simionatto E, Hess SC, Peres MTLP, Simitonatto EL, Júnior AW, et al. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hidrocotyle bonariensis* LAM (Araliaceae). Química Nova. 2009;32(9):2373-2376.
9. Silva JEN, Silva RGPO, Filho ALM, Silva CFC. Efeito alelopático de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC), sobre alface (*Lactuca sativa* L.) ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer-Goiânia, 2012, v. 8, N. 14; p. 423.
10. Silva JEN, Silva RGPO, Filho ALM, Araújo ML. Allelopathic effect of *Piper hispidinervum* on initial development of maize (*Zea mays*). Revista Agrarian Dourados. 2013;6(20):148-153.
11. Oliveira LGA, Duque FF, Belinelo VJ, Schmildt ER, Almeida MS. Allelopathic action of ethyl-acetate extract of the leaves of *Solanum cernuum* Vell. Revista Ciência Agronômica. 2013;44(3):538-543.
12. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research. 2009;682(1):71-81.
13. Luz AC, Pretti IR, Dutra JCV, Batitucci MCP. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 2012;14(4):635-642.
14. Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfelds AJFC, Martins-Junior HA, Bustilho JOWV, et al. Diesel emissions significantly influence composition and

mutagenicity of the ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. Environmental Research. 2005;98(1):1-7.

15. Grippa GA, Morozesk M, Nati N, Matsumoto ST. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. Revista Brasileira de Toxicologia. 2010;1(2):11-16.

16. 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*. [Trabalho de conclusão Bacharel Licenciatura - Ciências Biológicas]. Rio Claro/SP: Universidade Estadual Paulista; 2002, 52 p.

17. Arantes FFP. Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas. Viçosa, MG: [Dissertação UFV (Mestrado em Agroquímica)]. Universidade Federal de Viçosa, 2007;136 p.

18. Baldin ELL, Dal Pogetto MHFA, Pavarini DP, Lopes NP, Lopes JLC. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de *Lynchnophora ericoides* Mart. sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 2010;(36):127-134.

Recibido: 13 de agosto de 2013.

Aprobado: 31 de octubre de 2014.

MSc. Josivany V. de Freitas. Laboratório de Citogenética Vegetal, Molecular e Toxicológica. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal Campos, S/N Maruípe, Vitória, Espírito Santo. Brasil. CEP: 29040-091. Telefone: (55) 27-97530923 e (55) 27-33357495. Correo electrónico: josivanyfreitas@yahoo.com.br