



Avaliação da resposta do chá branco (*Camellia sinensis*) industrializado frente aos testes *Allium cepa* e micronúcleo ex-vivo em mucosa oral

Euclides Bezerra Luz¹, Rangel Pires da Silva², Tainá Azevedo Reis³, Rita de Cássia de Santana Teixeira⁴, Aracelli de Sousa Leite⁵, Michelle Mara de Oliveira Lima⁶

^{1,3}Bolsistas de Iniciação Científica do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do IFPI- Campus Floriano. e-mail: kutialoco@hotmail.com; e-mail: taina.reis.2@hotmail.com

^{2,4}Aluno(a) do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI. e-mail: rangel_pyres@hotmail.com; e-mail: rita.santa.t@hotmail.com;

⁵Doutoranda em Biotecnologia (RENORBIO) e professora do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI. email: aracellileite2003@yahoo.com.br.

⁶Professoras Pesquisadoras do IFPI Campus Floriano. Bolsistas do Programa de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica – ProAGRUPAR do IFPI. e-mail: michellelima@floriano.ifpi.edu.br

Resumo: O chá é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, tradição de cultura milenar, de origem chinesa, e configura relevante aumento de consumo na população ocidental. Os chás de *Camellia sinensis* são conhecidos por possuírem atividades antineoplásicas, antioxidantes, antimicrobiais, antiinflamatórias, conferindo proteção contra várias doenças. O objetivo deste estudo é avaliar as atividades tóxica, citotóxica, e mutagênica de chá branco industrializado, sachê (para o preparo da infusão) através dos testes *A. cepa* e micronúcleo de mucosa oral *ex-vivo*. Observou-se que a infusão de chá branco apresentou efeito tóxico e citotóxico ($P < 0,0001$) pelo teste *A. cepa* mas não apresentou efeito genotóxico pela frequência de aberrações cromossômicas. Pelo teste de micronúcleos da mucosa oral *ex-vivo* as concentrações testadas não apresentaram frequência significativa ($P > 0,05$) de cariólise e células binucleadas, no entanto apresentou significância através da frequência de cariorrexe ($P < 0,05$) indicando possível potencial apoptótico. Estudos indicam que os chás provindos da *Camellia sinensis* possuem vários benefícios à saúde, tais como: atividade antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras. No entanto, deve-se atentar à dosagem diária administrada, pois o excesso pode aumentar a ingestão de componentes tóxicos produzidos naturalmente pela planta.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, Chá branco, *Allium cepa*, micronúcleo *ex-vivo*.

1. INTRODUÇÃO

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo. É amplamente utilizado, em tradições culturais e consumido devido a suas características aromáticas e suas propriedades medicinais (NISHIYAMA et al., 2010). Estudos epidemiológicos e laboratoriais, sugerem que o consumo de chá, confere proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer (TIJBURG et al., 1998; YANG et al., 2000).

Tais benefícios do chá são atribuídos devido à presença de flavonóides, como catequinas e polifenóis (taninos), em sua composição. Ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação dos taninos, no entanto, estudos sugerem que o mesmo pode atuar na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), no controle celular e morte programada da célula (apoptose), na modificação das vias de transdução de sinais, e na indução de várias enzimas envolvidas no metabolismo de drogas e na desintoxicação (SANTANA-RIOS et al., 2001).

A planta *Camellia sinensis* (CS) é comumente cultivada em países com clima ameno e úmido, no entanto, a planta de melhor qualidade é a proveniente da China. A planta CS é um arbusto que pode atingir até 15 metros, com folhas simples, lanceoladas, coriáceas de 4 a 7 centímetros de comprimento, possui flores brancas, solitárias ou em grupos de duas ou três nas axilas foliares. Os frutos são cápsulas deiscuentes e oblongas possuindo uma ou três sementes (LORENZI, 2002). O chá branco é produzido a partir do brotos jovens de folhas, cobertas por pequenos filamentos prateados,



semelhantes a cabelos, colhidos apenas na primavera. Os brotos são cozidos no vapor e secos, este processo deve ser realizado logo após a colheita para evitar a oxidação (RUSACK et al., 2008).

Estudos realizados com chás demonstram que a CS possui amplos benefícios fisiológicos e farmacológicos. Atuam retardando o catabolismo das catecolaminas, exercem efeito antiinflamatório, acentuam a atuação do ácido ascórbico, agindo como antioxidante, inibe a enzima conversora de angiotensina, possui ação hipocolesterolêmico, inibe o crescimento de células malignas, dentre outros (HAMILTON-MILLER, 1995). O consumo de chá de CS aumenta a capacidade antioxidante do sangue em humanos, que consomem quantidades moderadas de chá por dia, este efeito antioxidante promove a redução de danos oxidativos, reduzindo-os a macromoléculas tais como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e membrana plasmática (COOPER et al., 2005).

Estudos epidemiológicos relacionam o consumo de chás da CS com resultados favoráveis em relação a doenças cardiovasculares, inflamações, obesidade e diabetes tipo II (GONDOIN *et al.*, 2010). A utilização destes chás tem sofrido grande aumento na comunidade ocidental devido a suas propriedades de aceleração do metabolismo. Estudos comprovam que os componentes fenólicos do chá reduziram a massa adiposa em roedores e aceleram a digestão de lipídios *in vitro* (KAO et al., 2006). Comprovou-se também eficácia antibacteriana na inibição de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae* e *Vibrio* spp. incluindo *V. cholerae* (TODA et al., 1989).

Hábitos dietéticos saudáveis e o estilo de vida também são importantes na prevenção do câncer e no retardo ao envelhecimento. Assim, a entrada de agentes quimiopreventivos e fotoprotetores a preparações tópicas, ou de forma oral, fornece maior aproximação à prevenção do câncer e ao envelhecimento celular. Para que se comprove a real eficácia dos constituintes do chá nesses processos, é necessário o investimento em estudos de fase II e III, prevendo assim as reais potencialidades biológicas do chá em humanos. (CAVALCANTI et al., 2007).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra e preparo da infusão

O chá branco a ser utilizado nesta pesquisa foi adquirido com comércio local (Floriano-Piauí). São brotos de flores e folhas de CS secas e trituradas até a textura de pó e acondicionadas industrialmente em sache (para infusão). Foram testadas três concentrações do chá branco, mensuradas a partir da dose recomendada pelo fabricante C1 = 0,771 g/L, C2 = 1,542 g/L e C3 = 3,084 g/L. Foi considerado tempo de infusão de no máximo 10 minutos.

2.1.1 Avaliação tóxica, citotóxica e genotóxica através do teste *Allium cepa*

Foram utilizadas cebolas pequenas de tamanho uniforme que foram adquirido no mercado de Floriano (PI). Os bulbos foram limpos e colocados em água corrente por 15 min. e colocados para germinar, com a parte inferior mergulhada na solução. Foram preparadas pelo menos três concentrações da infusão de chá branco. Como controle negativo foi utilizado água desclorificada e como controle positivo de sulfato de cobre (0,0012 g/L). Para cada tratamento foram utilizado 5 bulbos de cebola para cada controle. Após 48h de exposição em local escuro as raízes foram medidas, com o auxílio de uma régua. Em seguida, as raízes das cebolas de cada controle, foram cortadas e colocadas em Solução Carnoy e estocadas em solução etanol-água (70-30). As raízes foram lavadas 3 vezes com água destilada por 5 min. e em seguida colocadas em solução de HCl 1N por 11 min. e lavadas com água destilada. As raízes foram transferidas para frascos escuros, contendo Reagente de Schiff e depois foram lavadas para a retirada do excesso de corante. Para o preparo da lâmina, uma ou duas raízes foram colocadas sobre a lâmina e com uma pinça e bisturi, a região meristemática de aproximadamente 1 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Uma gota carmim acético 2% foi adicionada na amostra e uma lamínula foi colocada sobre a mesma. Depois do



“squash”, o material foi levado para o microscópio. Foram feitas uma lâmina para cada bulbo. A presença de micronúcleos foi determinada em 1000 células por lâmina.

2.1.2 Atividade mutagênica *ex-vivo* através do teste de micronúcleos em mucosa bucal humana

Células da mucosa bucal foram coletadas das duas bochechas, com o uso de escovas *cytobrush* (usadas na ginecologia para coleta de células cervicais). De acordo com KASSIE et al. (2001) e CASARTELLI et al. (2000) a “*cytobrush*” é a forma mais apropriada para a coleta de células esfoliadas de mucosa bucal. As células foram colocadas em 5 mL de solução salina (0,9% de NaCl), considerada um excelente meio de conservação das células até a etapa de preparação das lâminas (CASARTELLI et al., 2000; KASSIE et al., 2001). Os controles utilizados foram: controle negativo (células não expostas); controle positivo (peróxido de hidrogênio-0,0005%), infusão e suas variáveis de chá branco e a diluição do conteúdo da cápsula de chá branco. Foram preparadas duas lâminas por controle. As amostras de células foram lavadas duas vezes em solução salina e centrifugadas por 10 min a 1.500 rpm seguido de remoção do sobrenadante e substituição da solução sempre no volume final de 5 mL de solução salina. Numa terceira lavagem foram expostas *ex-vivo* a infusão e suas variáveis de chá branco por 30 min.. Em seguida foi centrifugado e retirado o sobrenadante. Antes da preparação do esfregaço as lâminas foram pré-aquecidas a 37° C. As células foram homogeneizadas no vórtex e colocadas sobre as lâminas para e deixadas em temperatura ambiente para a secagem durante 15 minutos na chapa quente. A fixação foi feita com metanol: ácido acético (3:1) por 15 min (CERQUEIRA et al. 2004; CERQUEIRA et al. 2008; THOMAS et al., 2008). Após a fixação, as lâminas ficaram em temperatura ambiente durante 12 horas e em seguida foram imersas em água destilada durante 1 min antes da coloração com Giemsa a 2% (GABRIEL et al., 2006). A observação das células foi feita com o uso de microscópio óptico. Cerca de 1000 células foram observadas por lâmina (TOLBERT et al., 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da atividade tóxica pelo crescimento das raízes observou-se que todas as concentrações testadas de chá branco possuem efeitos tóxicos quando comparado com o controle negativo, pela significativa ($P < 0,0001$) diminuição do tamanho das raízes. De forma semelhante, os dados da Tabela 1 mostram inibição significativa ($P < 0,0001$) da divisão celular das raízes de *A. cepa*, indicando efeitos citotóxicos. Entretanto, não foram encontrados efeitos genotóxicos significantes ($P > 0,05$) para as concentrações testadas de chá branco (Tabela 1).

Tabela 1 – Índice mitótico, aberrações cromossômicas e crescimento das raízes (média \pm desvio padrão) de espécimes de *A. cepa* expostos às concentrações de 0,771; 1,542 e 3,084 g/L de infusões de chá branco.

Grupos	Índice Mitótico (Células em divisão/1000)	Total de Aberrações Cromossômicas Frequência (%)	Toxicidade (Comprimento da raiz -cm)
CN ^a	54,8 \pm 13,6	0,94 \pm 0,31	1,30 \pm 0,10
CP ^b	11,3 \pm 4,8	2,80 \pm 0,41	0,16 \pm 0,01***
CS (0,771g/L) ^c	8,0 \pm 1,5***	0,82 \pm 0,75	0,25 \pm 0,04***
CS (1,542 g/L) ^d	7,6 \pm 2,1***	0,54 \pm 0,41	0,45 \pm 0,17***
CS (3,084 g/L) ^e	7,3 \pm 3,5***	0,36 \pm 0,35	0,46 \pm 0,05***

^a = Controle negativo (Água sem coloro); ^b = Sulfato de cobre (Sulfato de Cobre -0,0012 g/L); ^c = Infusão de Chá Branco (0,771 g/L); ^d = Infusão de Chá Branco (1,542 g/L); ^e = Infusão de Chá Branco (3,084 g/L) ; ***Diferença estatística $P < (0,001)$ em relação ao controle negativo. ANOVA teste de Tukey.



A citotoxicidade pode ser avaliada pela inibição da atividade mitótica. E isso pode ser acompanhada pelo aumento da frequência de células com aberrações cromossômicas. A supressão da atividade mitótica foi provavelmente devido ao bloqueio de G1, suprimindo a síntese de DNA da célula, ou bloqueio de G2, prevenindo as células de entrarem na mitose (FERETTI et al., 2008).

Em estudo similar os efeitos tóxicos e citotóxicos de infusões do chá verde orgânico com o teste A. cepa em três concentrações observou-se uma significativa inibição do crescimento e do índice mitótico das raízes ($P < 0,0001$) em relação ao controle negativo (LUZ et al., 2011).

Os parâmetros mutagênicos encontram-se expressos na Tabela 2. Não se observou aumento significativo ($P > 0,05$) pela frequência de micronúcleos quando comparado com o controle negativo. A frequência de cariólise (dissolução nuclear) e células binucleadas não foram significantes ($P > 0,05$) estaticamente, mas frequência de células com cariorrexe (fragmentação nuclear) foi significativa ($P < 0,05$) quando comparado com o controle negativo. Não há indicativos de citotoxicidade nas células de mucosa oral *ex-vivo* devido a não significância de células binucleadas. Indicativos apoptóticos foram encontrados através cariorrexe. A apoptose pode ser iniciada a partir da ativação do ciclo celular (JOURDLHEUIE et al, 1997; MARKS-HONCZALIK, 1998).

Tabela 2. Mudanças em células esfoliadas de mucosa bucal de humanos após exposição de 30 minutos *ex-vivo* às exposições às concentrações de 0,771; 1,542 e 3,084 g/L de infusões de chá branco.

Grupos	MN	%MN	KL	%KL	KR	%KR	BN	%BN
CN ^a	1,5 ± 0,7	0,15 ± 0,0	7,0 ± 1,4	0,7 ± 0,1	12,5 ± 3,5	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,7	0,25 ± 0,007
CP ^b	6,0 ± 1,4*	0,6 ± 0,1*	91,0 ± 1,4***	9,1 ± 0,1***	278,5 ± 51,6***	27,8 ± 5,1***	14,0 ± 2,1	1,4 ± 0,21
CS (0,771 g/L) ^c	1,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	18,0 ± 14,0	1,8 ± 1,4	437,0 ± 120,0*	43,7 ± 12,0*	3,0 ± 1,4	0,3 ± 0,14
CS (1,542 g/L) ^d	1,5 ± 0,7	0,1 ± 0,07	9,5 ± 3,5	0,95 ± 0,35	548,5 ± 139,3*	54,5 ± 13,9*	1,5 ± 0,7	0,15 ± 0,07
CS (3,084 g/L) ^e	2,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	6,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	534,0 ± 60,81*	53,4 ± 6,0*	5,5 ± 4,9	0,55 ± 0,49

Média ± Desvio Padrão de 1.000 células por lâminas de cada amostra (Lâminas em duplicata); MN (micronúcleos); KL (cariólise); BN (células binucleadas); KR (cariorrexe);^a Controle negativo = água desclorificada; ^b Controle Positivo = Peróxido de Hidrogenio (0,0005%); ^c = Infusão de Chá Branco (0,771 g/L); ^d = Infusão de Chá Branco (1,542 g/L); ^e = Infusão de Chá Branco (3,084 g/L). Significância em relação à frequência dos dados obtidos após a exposição, observada com o teste-Tukey (** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$).

Na busca de uma melhor qualidade de vida, atualmente, pode-se observar um aumento significativo no consumo de produtos naturais. A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, grande parte das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal (CARVALHO, 2006).

No entanto, contrapondo-se às pesquisas dos possíveis efeitos antioxidantes do chá preto, outros estudos realizados mostram que essa bebida em excesso pode ser danosa ao homem (CAO et al., 2004). Interações químicas entre os polifenóis do chá e sais inorgânicos, incluindo os de ferro



(Fe), devem ser mais observadas, pois quando em meio de cultura celular, tais interações levam à geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que pode atingir níveis citotóxicos (CHAI et al., 2003 apud BABICH et al., 2005).

Muitos alimentos possuem toxinas naturais em níveis muito baixo, variantes entre poucas partes por bilhão, estas toxinas são um subconjunto importante de substâncias químicas naturais da dieta. As plantas produzem pesticidas naturais para defender-se contra parasitas e predadores, existe aproximadamente dez mil pesticidas naturais presentes na dieta humana, testes realizados com alguns destes pesticidas revelou que alguns apresentaram atividade carcinógena em roedores (DA SILVA et al., 2003).

6. CONCLUSÕES

Através dos testes realizados observou-se que as concentrações testadas da infusão de chá branco apresentaram atividades tóxicas e citotóxicas, porém, não genotóxicas perante ao teste *A. cepa* através da frequência de aberrações cromossômicas. Com relação ao teste de micronúcleos em mucosa oral *ex-vivo* as concentrações testadas não apresentaram efeitos genotóxicos pela frequência de micronúcleo. Não há indicativos de citotoxicidade nas células de mucosa oral *ex-vivo* devido a não significância de células binucleadas. No entanto, indicativos apoptóticos foram encontrados através da frequência de cariorrexe.

O consumo de chá vem adquirindo crescimento exponencial devido a, principalmente, os seus inúmeros efeitos benéficos. No entanto, deve-se atentar à dose administrada diariamente, uma vez que o excesso pode vir a provocar alguns danos celulares e no material genético. Pesquisas a cerca dos efeitos dos chás obtidos através da CS devem passar para um novo estágio, onde deve-se chegar à dosagem diária ideal para que a população seja informada quanto aos riscos do consumo exagerado de substâncias químicas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFPI pelo apoio dado à pesquisa científica através do ProAgrupar.

REFERÊNCIAS

BABICH, H.; GOLD, T.; GOLD, R. Mediation of the in vitro cytotoxicity of green and black tea polyphenols by cobalt chloride. *Toxic. Letters*. 155, 195–205, 2005.

CAO, J.; LUO, S.F.; LIU, J.W.; LI, Y. Safety evaluation on fluoride content in black tea. *Food Chem*. 88, 233–236, 2004.

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticancer de produtos naturais e de síntese. *Multiciência: construindo a história dos produtos naturais* #7, 2006.

CAVALCANTI, A.S.S.; ROSA, J.A.B.; LIMA, M.S.C.S.; SILVA, A.G. O uso do chá verde, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) em produtos tópicos – uma revisão *Natureza on line* 5(2): 76-84, 2007. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>.

CERQUEIRA, E.M.M., GOMES-FILHO, I.S., TRINDADE, S., LOPES M.A., PASSOS, J.S., MACHADO-SANTELLI, G.M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutation Research*, v. 562, p. 11-117, 2004.

_____, MEIRELES, J.R.C.; LOPES, M.A., JUNQUEIRA, V.C; GOMES-FILHO, TRINDADE, S.M., MACHADO- SANTELLI, G.M. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol*, v. 37, p. 398-403, 2008.

CHAI, P.C.; LONG, L.H.; HALLIWELL, B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 304, p.650–654, 2003.

COOPER, R.; MORRÉ, J.; MORRÉ, D.M. Medicinal benefits of green tea: part II. review of anticancer properties. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 11: 639-652, 2005.



- DA SILVA, J. et al.(Org) Genética Toxicológica. Editora Alcance, Porto Alegre, 2003.
- FERETTI, D.; ZERBINI, I.; CERETTI, E.; VILLARINI, M.; ZANI, C.; MORETTI, M.; FATIGONI, C.; ORIZIO, G.; DONATO, F.; MONARCA, S. Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays in vitro DNA damage tests. Elsevier. 2008.
- GABRIEL H.E., CROTT J., GHANDOUR, H., CHOI S.W., DALLAL G., KEYES M., JANG, H., LIU, Z., NADEAU, M., JOHNSTON, A., MAGER D., MASON, J. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *American Journal Clinical Nutrition*, v. 83, p. 835–841, 2006.
- GONDOIN, A.; GRUSSU, D.; STEWART, D.; MCDOUGALL, G.J. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research International* 43, 1537 – 1544, 2010.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, nov. p. 2375-2377, 1995.
- JOURD'HEUIL D, MORISE Z, CONNER EM, KUROSE J, GRISHAM MB. Oxidant-regulation of gene expression in the chronically inflamed intestine. *Keio J Med*. 46:10–15, 1997.
- KAO, Y.H.; CHANG, H.H.; LEE M. J. ; CHEN, C. L. Tea obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. And Food. Res.*, 50, 188-210, 2006.
- KASSIE, F. DARROUDI F., KUNDI, M., SCHULTE-HERMANN, R., KNASMULLER, S. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *International Journal of Cancer*, v. 92, p. 329-332, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, 2002.
- LUZ, E. B.; REIS, T. A.; TEXEIRA, R. de C. de S; LIMA, M. M. O.; LEITE, A. de S. Efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico da infusão do chá verde através do biomarcador *Allium cepa*. In: VI CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, Natal, 2011.
- MARKS-HONCZALIK J, CHU SC, MOSS J. Cytokine-mediated transcriptional induction of human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein-1 and nuclear factor κ B binding sites. *J Biol Chem*. 273:22201–22208, 1998.
- NISHIYANA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C.G. M., BOER, C. G.; BROCHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Cien. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30 (Supli.1): 191 – 196, 2010.
- SANTANA-RIOS, G., ORNER, A. G., AMANTANA, A., PROVOST, C., WU, S.Y. DASHWOOD, R. H. Potent antimutagenic activity of White tea in comparison with Green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research* 495, 61-74, 2001.
- THOMAS, P., HARVEY, S., GRUNER, T.M., FENECH, M., The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research*, v. 638, p. 37-47, 2008.
- TIJBURG, L.B.M; MATTERN, J.D.; FOLTS, U.M; WIESGERBER, M.B.; KATAN. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit. Ver. Food Sci. Nutr*. 37, 771-785, 1987.
- TODA, M.;OKUBO, S.;HIYOSHI, R.; SHINAMURA, T. the bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol*.8:123-1459, 1989.
- TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff user. *American Journal of Epidemiology*, v. 134, p. 840–850, 1991.



YANG, C.S.; CHUNG, J.Y.; YANG, G.; CHHABRA,S.K.; LEE, M.J. Tea and tea polyphenols in cancer prevention, J. Nutr. 2S, 472S–478S, 2000.