

**ANGÉLICA RICHART CSIPAK**

**Potencial antimutagênico e antigenotóxico de compostos isolados da planta *Casearia sylvestris* em camundongos tratados com compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.**

**ARARAQUARA**

**2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMPUS DE ARARAQUARA**

**CITOLOGIA CLÍNICA**

**MONOGRAFIA**

**Potencial antimutagênico e antigenotóxico de compostos isolados da planta *Casearia sylvestris* em camundongos tratados com compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

*Graduanda: Angélica Richart Csipak*

*Orientadora: Profª Drª Christiane Pienna Soares*

**ARARAQUARA**

**2011**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
LISTA DE SÍMBOLOS.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. <i>Casearia sylvestris</i> .....	14
1.2. Casearinas .....	15
1.3. Teste do Micronúcleo (MN) .....	17
1.4. Ensaio do Cometa.....	18
1.5. Biomassa de Queima de Cana-de-Açúcar .....	19
1.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....	19
2.OBJETIVOS .....	20
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	21
3.DESENVOLVIMENTO .....	21
3.1. Obtenção do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	21
3.2. Solubilização do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	22
3.3. Obtenção da Casearina U .....	22
3.4. Solubilização da casearina.....	23
3.5. Coleta do Material Particulado Atmosférico Total – através de filtro (PTS).....	23
3.6. Análise cromatográfica dos extratos orgânicos .....	25

3.6.1. HPLC/Fluorescência.....	25
3.6.2. GC/MS.....	27
3.7. Avaliação de antimutagenicidade e antigenotoxicidade .....	28
3.7.1. Animais.....	28
3.7.2. Ensaio do Cometa .....	30
3.7.3. Teste de micronúcleo .....	32
3.8. Porcentagem de inibição - Extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> e casearina U.....	33
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
5. RESULTADOS .....	34
5.1. Material Particulado Atmosférico Total – através de filtro (PTS) .....	34
5.2. <i>Casearia sylvestris</i> .....	36
5.2.1 Avaliação da atividade antigenotóxica do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através do ensaio do Cometa .....	36
5.2.2 Avaliação da atividade antimutagênica do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através do teste do Micronúcleo.....	38
5.2.3. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	40
5.3. Casearina U .....	41
5.3.1 Avaliação da atividade antigenotóxica da Casearina U através do ensaio do Cometa.....	41
5.3.2 Avaliação da atividade antimutagênica da Casearina U através do teste do MN..	43
5.3.3. Avaliação da citotoxicidade da Casearina U .....	45
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÕES .....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

Compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar têm ação genotóxica sobre os organismos vivos, contribuindo para mutagenicidade celular e desenvolvimento do câncer. Extratos vegetais vêm sendo estudados para avaliar sua capacidade de modificar a atividade de agentes mutagênicos. O presente estudo objetivou avaliar o eventual efeito antimutagênico e antigenotóxico do extrato etanólico da planta *Casearia sylvestris* e de uma substância pura isolada (Casearina U), frente efeito mutagênico e genotóxico de compostos orgânicos extraídos do particulado de queima de cana-de-açúcar. Durante 15 dias camundongos dos grupos teste (n=10) foram tratados com extrato etanólico de *C. sylvestris* nas concentrações de 0,13; 0,25 e 0,5 mg/mL (3,9; 7,5 e 15 mg/kg) ou com Casearina U nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,04 mg/mL (0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg) através de gavagem, administrando posteriormente compostos orgânicos extraídos do particulado de queima de cana-de-açúcar (0,3mg/mL) por via intraperitoneal. Foi utilizado também o grupo controle negativo (tratado com água por gavagem e salina intraperitoneal), controle positivo (água por gavagem e ciclofosfamida 50mg/kg) e controle de poluente (água por gavagem e particulado de queima de cana-de-açúcar via intraperitoneal). Foi realizado teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongo para avaliação do efeito antimutagênico do extrato etanólico de *C. sylvestris* e da Casearina U. O extrato etanólico de *C. sylvestris* demonstrou efeito protetor antimutagênico nas concentrações de 3,9 mg/kg ( $p<0,01$ ), 7,5 mg/kg ( $p<0,01$ ) e 15,0 mg/kg ( $p<0,05$ ), com as respectivas porcentagens de inibição de 81,25, 80,47 e 60,94%. Não foi observada diferença estatística entre as quantidades de eritrócitos

policromáticos e normocromáticos, indicando que a redução do número de micronúcleos está relacionada à proteção contra danos no DNA, e não à citotoxicidade. Com relação à substância isolada Casearina U, não foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente e os grupos teste tratados nas concentrações 0,3, 0,6 e 1,2 mg/kg, o que indica que a Casearina U não apresentou atividade antimutagênica em nenhuma concentração testada. Para a avaliação de efeito antigenotóxico do extrato etanólico de *C. sylvestris* e da Casearina U, foi realizado o ensaio do cometa em células do sangue periférico de camundongo. Foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com extrato etanólico de *C. sylvestris* nas concentrações 3,9 ( $p < 0,0005$ ), 7,5 ( $p < 0,005$ ) e 15,0 mg/kg ( $p < 0,0005$ ), com as respectivas porcentagens de inibição de 96,82, 91,72 e 95,54%, indicando que o extrato etanólico apresentou atividade antigenotóxica em tais concentrações. Também houve significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com Casearina U nas concentrações 0,3 mg/kg ( $p < 0,0005$ ), 0,6 mg/kg ( $p < 0,0005$ ) e 1,2 mg/kg ( $p < 0,001$ ), com as respectivas porcentagens de inibição de 92,36, 88,89 e 82,64%, o que indica atividade antigenotóxica da Casearina U nessas concentrações.

Os resultados indicam que o extrato etanólico de *C. sylvestris* possui atividade antimutagênica e antigenotóxica frente aos danos de DNA ocasionados por compostos orgânicos isolados de particulado total em suspensão de queima de cana de açúcar, enquanto que a substância pura Casearina U apresentou somente efeito antigenotóxico, mas não antimutagênico, frente a tais danos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: *Casearia sylvestris*. A) Imagem da árvore; B) Imagem com as folhas em detalhe.....14
- Figura 2: Estrutura geral das casearinas. Os radicais: R1, R2, R3, R4 e R5 estão demonstrados na tabela 1.....15
- Figura 3: Aparelho portátil HANDI-VOL instalado na sacada de um apartamento no centro da cidade de Araraquara.....24
- Figura 4: Esquema de tratamento pelo qual os camundongos foram submetidos para a avaliação de antigenotoxicidade e antimutagenicidade.....30
- Figura 5: Micronúcleo (seta) em eritrócito policromático da medula óssea de camundongo Balb-C.....33
- Figura 6: Análise do cometa. A) Controle de poluente, B) Controle Negativo e C) Grupo tratado com *C. sylvestris* 3,9 mg/kg. As demais concentrações apresentaram o mesmo perfil de cometa apresentado em C) e não foram demonstradas nessa figura.....36
- Figura 7: Inibição (%) do efeito genotóxico observado no tratamento com extrato etanólico de *Casearia sylvestris* nas concentrações de 3,9, 7,5 e 15,0 mg/kg ao efeito genotóxico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.....37
- Figura 8: Inibição (%) do efeito de formação de micronúcleo observado no tratamento do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* nas concentrações de 3,9, 7,5 e 15,0 mg/kg

ao efeito mutagênico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.....	39
-Figura 9: Análise do cometa. A) Controle de poluente, B) Controle Negativo e C) Grupo tratado com Casearina U 0,3 mg/kg. As demais concentrações apresentaram o mesmo perfil de cometa apresentado em C) e não foram demonstradas nessa figura.....	41
-Figura 10: Inibição (%) do efeito genotóxico observado no tratamento com casearina U nas concentrações de 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg ao efeito genotóxico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.....	42
-Figura 11: Inibição (%) do efeito de formação de micronúcleo observado no tratamento com a substância pura casearina U nas concentrações de 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg, frente ao efeito mutagênico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.....	44



## LISTA DE TABELAS

-Tabela 1: Radicais das diferentes casearinas.....	16
-Tabela 2: Limites de detecção (LD) para o sistema HPLC/Fluorescência.....	25
-Tabela 3: Concentração de HPA no material particulado atmosférico em suspensão (PTS) coletado durante a safra de queima de cana-de-açúcar e características mutagênicas e carcinogênicas desses HPAs.....	35
- Tabela 4: Avaliação de antigenotoxicidade do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através do Ensaio do Cometa.....	38
-Tabela 5: Tabela 5: Avaliação de antimutagenicidade e citotoxicidade do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através do teste do micronúcleo.....	40
-Tabela 6: Avaliação de antigenotoxicidade da Casearina U através do Ensaio do Cometa.....	43
- Tabela 7: Avaliação de antimutagenicidade e citotoxicidade da Casearina U através do Teste do Micronúcleo.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila;

CP: Controle de poluente;

CV1: Controle de veículo 1;

CV2: Controle de veículo 2;

cm: Centímetros;

DCM: diclorometano;

DMSO: dimetilssulfóxido;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

EFS: Extração em fase sólida;

ENCs: Normocromáticos;

EPCs: Policromáticos;

GC/MS: cromatografia gasosa/ espectrometria de massa;

HPAs: Hidrocarboneto Policíclico Aromáticos;

HPLC: High Performance Liquid Chromatography;

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

kg: quilograma;

LD: Limite de detecção;

MeOH: metanol;

mg: miligrama;

mL: mililitro;

mmHg: milímetro de mercúrio;

MN: Micronúcleo;

nm: nanômetro;

OAc: acetato;

OBu: butanoato;

ODc: decanoato;

OEt: etoxila;

OMe: metoxila;

PBS: tampão salina fosfato;

PTS – particulado total;

TM: Tail Moment.

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem;

°C: graus Celsius;

µg: micrograma;

µL: microlitro;

µm: micrômetro;

C+: Controle positivo;

C-: Controle Negativo;

m<sup>3</sup>: metro cúbico;

## 1. INTRODUÇÃO

Há séculos, extratos de plantas vem sendo utilizados em medicamentos tradicionais no tratamento de diversas doenças e, recentemente, tem despertado interesse devido às propriedades quimiopreventivas demonstradas em compostos derivados de plantas (MANSOUR et al., 2007).

Atualmente, extratos vegetais e compostos isolados de plantas são estudados para avaliar sua capacidade de modificar a atividade de agentes mutagênicos e carcinogênicos (MERWE et al, 2006). Adicionalmente, as plantas possuem uma série de compostos, como flavonóides, taninos e diterpenos, que poderiam apresentar efeito protetor contra danos no DNA (DHIR et al., 1993; COZZI et al, 1997; CAVIN et al., 2001).

Pesquisas demonstram que o desenvolvimento de doenças como o câncer é caracterizado pela contribuição de diversos fatores, incluindo mutações gênicas provocadas pela exposição a fatores ambientais. (MIGLIORE e COPPEDE, 2002). Assim, para prevenir problemas relacionados à genotoxicidade, é importante diminuir a exposição a mutágenos conhecidos e proporcionar a exposição a substâncias antígenotóxicas, comumente encontradas nas plantas (EDENHARDER et al., 2002; IKUMA et al., 2006; JEONG et al., 2006). Nesse sentido, já há um estudo realizado com o objetivo de identificar novos compostos que possam proporcionar atividade antígenotóxica (CARIÑO-CORTÉS et al., 2007).

### 1.1. *Casearia sylvestris*

Espécie de planta popularmente conhecida como “guaçatonga”, “pau de lagarto” e “erva de pontada”, pode ser encontrada na América do Sul e Central (Figura 1). Devido ao uso popular, nos últimos anos vêm surgindo diversos estudos científicos que pesquisam atividades farmacológicas dessa planta. Segundo nosso conhecimento, há um trabalho que descreve a ausência de genotoxicidade do extrato etanólico em células (MAISTRO et al., 2004). Os resultados obtidos em nosso estudo, utilizando o ensaio de micronúcleo, parecem-nos promissores ao seu efeito antimutagênico, indicando que a *Casearia sylvestris* aparentemente tem atividade anti-clastogênica importante em algumas concentrações testadas (dados não publicados).



Figura 1: *Casearia sylvestris*. A) Imagem da árvore; B) Imagem com as folhas em detalhe. Disponível em:[http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie\\_detalhes.php?nome\\_filtrado=cha-de-bugre\\_cafezinho-do-mato\\_quacatunga](http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie_detalhes.php?nome_filtrado=cha-de-bugre_cafezinho-do-mato_quacatunga)

## 1.2. Casearinas

Recentemente, diversas pesquisas têm sido realizadas em substâncias derivadas de plantas, com o objetivo de promover o isolamento, obtenção e caracterização de moléculas que apresentem atividade biológica. Tais pesquisas podem representar uma das primeiras etapas que proporcionam a síntese laboratorial de novos compostos com atividade farmacológica. A planta utilizada no presente estudo, *Casearia sylvestris*, possui moléculas conhecidas como casearinas (figura 2) que receberam a denominação de casearinas A-Y (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA, et al. 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2001; TININIS, 2006). Essas moléculas pertencem à classe dos diterpenos cloredânicos.

Essas substâncias foram os primeiros diterpenos encontrados em *C. sylvestris*, totalizando 24 compostos obtidos a partir de extratos etanólicos das folhas de *C. sylvestris* (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; SANTOS, 2001; TININIS, 2006).

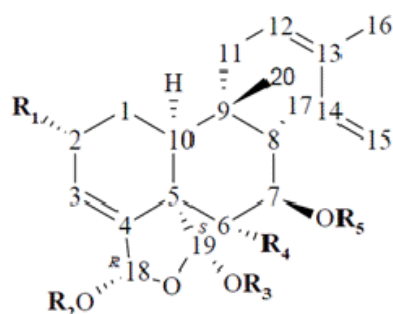


Figura 2: Estrutura geral das casearinas. Os radicais: R1, R2, R3, R4 e R5 estão demonstrados na tabela 1 (MORITA, et al, 1991).

A molécula escolhida para a realização de nossos estudos foi a casearina U, por ser uma das mais abundantes no extrato etanólico de *C. sylvestris* (SANTOS, 2001), possibilitando a obtenção de quantidade suficiente da substância isolada para a realização dos testes propostos.

Tabela 1: Radicais das diferentes casearinas

Casearinas	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
<b>A<sup>1</sup></b>	OMe	OAc	OAc	OH	OBu
<b>B<sup>1</sup></b>	OMe	OAc	OAc	OAc	OBu
<b>C<sup>1</sup></b>	OH	OAc	OAc	OAc	ODc
<b>D<sup>1</sup></b>	OH	OBu	OAc	OH	OBu
<b>E<sup>1</sup></b>	OH	OEt	OAc	OH	ODc
<b>F<sup>1</sup></b>	OH	OEt	OAc	OH	OBu
<b>G<sup>2</sup></b>	OMe	OAc	OAc	H	OBu
<b>H<sup>2</sup></b>	OH	OAc	OAc	H	OBu
<b>I<sup>2</sup></b>	OH	OAc	OBu	H	OBu
<b>J<sup>2</sup></b>	OMe	OBu	OAc	OH	OBu
<b>K<sup>2</sup></b>	OAc	OAc	OAc	OH	OBu
<b>L<sup>2</sup></b>	OMe	OBu	OAc	OAc	OH
<b>M<sup>2</sup></b>	OH	OBu	OBu	OAc	OH
<b>N<sup>2</sup></b>	OMe	OAc	OBu	OAc	OBu
<b>O<sup>2</sup></b>	OMe	OBu	OAc	OAc	OBu
<b>P<sup>2</sup></b>	OMe	OAc	OAc	OAc	OAc
<b>Q<sup>2</sup></b>	OH	OAc	OAc	OAc	OBu
<b>R<sup>2</sup></b>	= O	OAc	OAc	OH	OBu
<b>S<sup>3</sup></b>	OMe	= O	OAc	H	OBu
<b>T<sup>3</sup></b>	OMe	OAc	OAc	OAc (β)	OBu
<b>U<sup>4</sup></b>	OBu	OBu	OAc	OH	H
<b>V<sup>5</sup></b>	OBu	OAc	OAc	OH	H
<b>X<sup>5</sup></b>	OBu	OAc	OAc	H	OBu
<b>Y<sup>5</sup></b>	OMe	OAc	OBu	H	OBu

OAc: acetato; OBu: butanoato; ODc: decanoato; OEt: etoxila; OMe: metoxila.

Referências: 1- ITOKAWA et al., 1990; 2- MORITA et al., 1991; 3- CARVALHO et al., 1998; 4- SANTOS, 2001; 5- TININIS, 2006.



### 1.3. Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do MN permite a correlação entre a formação de MN, na medula óssea ou em eritrócitos periféricos, e os danos genéticos nas células expostas ao agente genotóxico (RODGERS et al., 2001). Inicialmente, o teste foi utilizado em plantas por EVANS et al. em 1959 e, posteriormente, em medula óssea de ratos, sendo idealizado como um método citogenético quantitativo para avaliar a frequência de danos cromossômicos “in vivo” em células nucleadas (HEDDLE, 1973; VANPARYS et al., 1992).

O micronúcleo é considerado um produto de quebra do DNA genômico de células eucarióticas. A exposição a radiações e/ou substâncias mutagênicas pode ocasionar danos cromossômicos, alterando a distribuição do material genético entre as células filhas durante a divisão celular. Assim, fragmentos de cromossomos podem ser distribuídos a qualquer célula-filha e, não sendo incorporados ao núcleo, podem ser observados em microscópio óptico sob a forma de micronúcleos. Assim, o Teste do MN tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (CHUNG, et al, 2002; DING, et al, 2003). Por ser um teste simples, confiável e sensível, tem sido utilizado para a avaliação de mutagenicidade de compostos químicos oriundos do meio ambiente, os quais podem exercer atividades clastogênicas (capacidade ou predisposição a quebra cromossômica), aneugênicas (capacidade ou predisposição de alterar o fuso mitótico resultando na perda de cromossomo), ou ambas (TOROUS, et al., 1998).

Assim, o teste do MN é recomendado pelo OECD (Organization for Economic CO-Operation & Economic Development) como requerimento para testes em novos produtos químicos (VANPARYS, et al., 1992).

#### **1.4. Ensaio do Cometa**

O Ensaio do Cometa foi desenvolvido através da utilização de dois protocolos descritos na literatura por Singh et al. em 1988 e Olive em 1989, sendo que a versão de Singh et al. foi eleita o protocolo para estudos de biomonitoramento (FAIRBAIRN et al., 1995).

O teste apresenta diversas vantagens, entre elas, a grande sensibilidade para detecção de pequenos níveis de danos no DNA, sua fácil execução, seu relativo baixo custo e a necessidade de curto tempo para a obtenção dos resultados (TICE et al., 2000). Além disso, através do ensaio do cometa, é possível detectar danos de DNA recentes e ainda passíveis de serem reparados (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; MOLLER, 2005).

Nos últimos anos, esse ensaio vem sendo utilizado para avaliar o potencial genotóxico e a atividade antigenotóxica de produtos naturais (LIMA et al., 2001; RODEIRO et al., 2006) o que o torna um método indicado para avaliar a atividade antigenotóxica do extrato etanólico de *C. sylvestris* e da Casearina U.

### **1.5. Biomassa de Queima de Cana-de-Açúcar**

Após a inalação do particulado total da queima, as moléculas de particulados podem alcançar diferentes regiões do trato respiratório, estando associadas a doenças respiratórias e pulmonares, que podem ser agravadas, por inalação de material particulado ou gases poluentes do meio ambiente (BUSCHINI, et al., 2001; DOCKERY et al., 1994 e SCHWARTZ et al., 1993). Esses particulados emitidos têm ação genotóxica sobre os organismos vivos, contribuindo usualmente para mutagenicidade celular (SCARPATO et al., 1993), e presume-se que a mutagênese presente nas células possa contribuir para o desenvolvimento do câncer (CURY et al., 2000; SOARES et al., 2003). Assim, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos têm sido considerados potenciais indutores de mutagênese e carcinogênese (LEWTAS et al., 1992).

### **1.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)**

Os HPAs pertencem a um grupo de carcinógenos químicos, formados pela fusão de um ou mais anéis benzênicos condensados (FINE et al, 1997), podendo ser encontrados em plantas terrestres e aquáticas, solos, sedimentos, águas naturais e marinhas e, particularmente, na atmosfera (TAO et al., 2004). As principais fontes desses compostos nocivos são provenientes da emissão de material particulado da queima de plantações agrícolas ou da madeira queimada em fogão a lenha, combustão do carvão, incêndio de florestas e motores de veículos (LEWTAS et al., 1992).

Estudos recentes conduzidos em nosso laboratório demonstram o aumento da frequência de micronúcleos em células mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida* tratados com diferentes concentrações de compostos orgânicos contendo Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e que foram extraídos nos períodos de safra e entressafra de cana-de-açúcar (comunicação pessoal). Esse estudo demonstrou que os compostos orgânicos extraídos e ricos em HPAs apresentavam potencial mutagênico.

Assim, o estudo de compostos isolados de plantas brasileiras que possam ter atividade antimutagênica e antígenotóxica seria de fundamental importância para prevenção dos efeitos mutagênico e genotóxico dos particulados provenientes da queima de cana-de-açúcar. Além disso, estudos relacionados ao uso de compostos químicos provenientes de plantas Brasileiras para proteção dos efeitos adversos da poluição atmosférica, em especial de particulados de queima de cana, são escassos na literatura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a capacidade antimutagênica e antígenotóxica do extrato etanólico e de uma substância pura (casearina U) de *Casearia sylvestris* em células sanguíneas de camundongos, frente aos efeitos mutagênicos de compostos orgânicos, ricos em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), extraídos do particulado total de queima de cana-de-açúcar.

## 2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar comparativamente o eventual efeito antimutagênico do extrato etanólico e de substância pura (casearina U) da planta *Casearia sylvestris*, ao efeito mutagênico de compostos orgânicos extraídos do particulado de queima de cana-de-açúcar, na concentração de 0,3 mg/mL, em células de medula óssea de camundongos Balb-c machos, utilizando o método de micronúcleo.
  
- 2) Avaliar o efeito antigenotóxico do extrato etanólico e da casearina U isolada de *C. sylvestris* ao efeito genotóxico de compostos orgânicos extraídos do particulado de queima de cana-de-açúcar, na concentração de 0,3 mg/mL, utilizando o ensaio do cometa.

## 3. DESENVOLVIMENTO

### 3.1. Obtenção do extrato etanólico de *C. sylvestris*

A coleta das folhas de *C. sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) foi realizada no Parque Estadual Carlos Botelho (São Paulo). Foram então depositadas no herbário estadual "Maria Eneida P. Kaufmann", do Instituto Botânico de São Paulo, as espécies AGS13, AGS19 e AGS23. Os 20,5 de folhas secas de *C. sylvestris* foram submetidos à extração por remaceração com etanol absoluto (2 x 100,0 L; 40 °C; tempo total de 23h).

A solução obtida foi submetida à evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato etanólico, que foi fornecido pelo Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

### **3.2. Solubilização do extrato etanólico de *C. sylvestris***

O extrato etanólico de *C. sylvestris* foi solubilizado em Tween 20 (20%) nas concentrações 0,13; 0,25; 0,5 mg/mL o que equivale a 3,9; 7,5; 15 mg/kg de peso corpóreo.

### **3.3. Obtenção da Casearina U**

A casearina testada foi a casearina U, uma vez que essa molécula é uma das mais abundantes no extrato etanólico, estando presente neste extrato em cerca de 8% e sendo facilmente isolada. As folhas secas e moídas foram submetidas à extração com etanol e o fracionamento do extrato etanólico foi realizado por extração em fase sólida (EFS), obtendo-se 3 frações. O fracionamento da fração 2 da EFS por cromatografia em coluna, permite a obtenção de 41 frações, que foram purificadas em cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo-se assim a casearina U. A substância pura foi isolada no Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

### **3.4. Solubilização da casearina**

A casearina pura foi solubilizada em solução de Tween 80 (6%) nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,04 mg/mL, o equivalente a 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg de peso corpóreo. As concentrações testadas de casearina U corresponderam a 8% daquelas testadas no extrato etanólico.

### **3.5. Coleta do Material Particulado Atmosférico Total – através de filtro (PTS)**

A coleta do material particulado do ar atmosférico total foi realizada através do equipamento portátil HANDI\_VOL (Figura 3), com filtro de fibra de vidro (Energética) com 10 cm de diâmetro, sendo que foi recolhido um filtro a cada 24 horas. O equipamento foi instalado na sacada de um apartamento no centro da cidade de Araraquara, interior do Estado de São Paulo, a 50 metros do solo, com altura superior a das árvores e a uma distância de cerca de 8 a 10 quilômetros das áreas destinadas aos canaviais. Para o presente estudo foram avaliados sete filtros recolhidos em os dias 04 a 10 de julho de 2007.



Figura 3 – Aparelho portátil HANDI-VOL instalado na sacada de um apartamento no centro da cidade de Araraquara (PERON, 2006).

Para a determinação da massa total de particulado obtida, os filtros foram pesados antes e após a amostragem. O volume de ar aspirado foi obtido a partir da vazão e do tempo de amostragem, com correção em função das condições padrão (25°C, 760 mmHg). Para avaliar a concentração do material particulado em suspensão no ar ambiente - expressa em microgramas por metro cúbico ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) - foi utilizada a massa de partículas coletadas, dividindo-se esse valor pelo volume de ar amostrado.

A extração foi realizada em uma solução de diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (4:1). Os sete filtros obtidos após a amostragem foram cortados em pequenos pedaços e colocados em um Erlenmeyer já contendo 50ml da solução de DCM : MeOH 4:1 (BARBOSA et al, 2006). Então, o Erlenmeyer foi submetido a um banho de ultrassom durante 30 minutos. Com a utilização de seringa com filtro 0,45  $\mu\text{m}$  (Corning), foi realizada a filtração, e ainda, o filtrado foi concentrado em equipamento



rotaevaporador à 40°C até um volume de cerca de 5 mL. Logo após, o material obtido foi evaporado até a secura completa sob fluxo leve de nitrogênio. O resíduo seco foi ressuspensionado em dimetilssulfóxido (DMSO) e diluído para uma concentração final de 0,3 mg/mL

### 3.6. Análise cromatográfica dos extratos orgânicos

#### 3.6.1. HPLC/Fluorescência

Para a realização da análise cromatográfica do material particulado obtido, foi utilizado o equipamento HPLC Pro Star com injetor automático (Model 400) e detector de fluorescência (Model 360) da Varian (Walnut Creek, USA). Para a construção das curvas de calibração, foi injetada uma mistura treze HPAs estudados. Os limites de detecção (LD) do sistema analítico utilizado podem ser observados na Tabela 2. Estes limites foram calculados segundo o preconizado pela IUPAC (CURRIE, 1999).

Tabela 2: Limites de detecção (LD) para o sistema HPLC/Fluorescência (ANDRADE, 2000)

HPA	LD(pg)
Fenantreno	16,2
Antraceno	0,94
Fluoranteno	58,7
Pireno	4,41

Benzo[a]antraceno	5,67
Criseno	33,3
Benzo[e]pireno	3,43
Benzo[e]acefenantrileno	3,63
Benzo[k]fluoranteno	0,56
Benzo[a]pireno	10,2
Dibenzo[a,h]antraceno	120
Benzo[g,h,i]perileno	107
Indeno[1.2.3-cd]pireno	33,2

Através das equações de reta obtidas, foi possível interpolar as áreas dos picos obtidos nos cromatogramas dos extratos do material particulado ressuspenso. As condições cromatográficas utilizadas para determinação analítica dos HPAs foram as seguintes (ANDRADE, 2000):

-Coluna: Supelcosil LC-PAH (25 cm X 4,6 mm, 5  $\mu$ m) da Supelco (Milwaukee, USA).

-Eluente: Acetonitrila (ACN) e água

-Acetonitrila: 60% (5 min)-----20min-----100% (15 minutos),

-Vazão: 1,5 mL .min<sup>-1</sup>

-Volume de injeção: 30  $\mu$ L

Os comprimentos de ondas de excitação e emissão utilizados foram: Naftaleno, Acenafteno e Fluoreno (220 e 322 nm), Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[e]pireno, Benzo[e]acenaftileno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno, Benzo[g,h,i]perileno (240 e 398 nm) e Indeno(1,2,3-cd)pireno (300 e 498 nm).

### 3.6.2. GC/MS

Para a confirmação da presença de HPAs nos extratos foi utilizado o equipamento GC (3800) com injetor automático (8200 cx) acoplado a um espectrômetro de massas (Saturn 2000) da Varian, considerando que a sensibilidade do GC/MS é muito menor que a sensibilidade do HPLC/Fluorescência para quantificação dos HPAs (ESCRIVÁ et al., 1994). O resíduo foi ressuspenso em volume adequado de acetonitrila (ACN) e o extrato foi injetado nas seguintes condições (ZAMPERLINI et al., 1997):

-Coluna: CP Sil 8 CB (30 m X 0,25 mm, 25  $\mu$ m) (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) (Chrompack-Varian)

-Gás de arraste: Hélio

-Volume de injeção: 2  $\mu$ L

-Vazão: 1,0 mL. min<sup>-1</sup>

-Temperatura do injetor: 250 °C

-Rampa de aquecimento do forno:

-90°C (1min) ---<sup>10</sup>--- 120°C ---<sup>4</sup>--- 310°C(20min)

-Temperatura do trap: 180 °C

-Temperatura do Manifold: 50 °C

-Temperatura da linha de transferência: 200 °C

### **3.7. Avaliação de antimutagenicidade e antigenotoxicidade**

#### **3.7.1. Animais**

Para o presente estudo, foram utilizados 160 camundongos (80 para a avaliação do efeito do extrato etanólico de *C. sylvestris*, e 80 para a avaliação do efeito da casearina) Balb-C, machos, pesando em média 20 g, procedentes do biotério do CEMIB, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tratados com ração (NUVITAL) e água estéril, mantidos em gaiolas com maravalha também estéril (Comitê de Ética em animais processo CEP/FCF/CAr. nº 38/2006). Os experimentos foram conduzidos inicialmente para avaliação do efeito protetor do extrato etanólico de *C. sylvestris*, e, posteriormente, para avaliação do efeito protetor da casearina. Para o tratamento foi realizado um protocolo para ensaio protetor segundo proposto por (SUGUI et al., 2003).

Os animais foram separados em 8 grupos: um grupo controle negativo (C-), um grupo controle positivo (C+), grupo controle de veículo Tween 20 a 20% / Tween 80 a 6% (CV1), grupo controle de veículo DMSO 1% (CV2), um grupo controle de poluente

(CP) – testado com o extrato orgânico contendo HPAs para confirmar sua atividade mutagênica e genotóxica – e 3 grupos teste.

Assim, nos grupos teste e controles (positivo e negativo) os tratamentos foram administrados por gavagem durante 15 dias com intervalo de 24 horas entre as aplicações, sendo que o grupo controle positivo recebeu água por gavagem (0,6mL) e ciclofosfamida intraperitoneal (0,3 mL - dose única); os grupos teste receberam o extrato etanólico de *C. sylvestris* / casearina por gavagem (0,6 mL) e extrato orgânico de poluente a 0,3 mg/mL intraperitoneal (0,3 mL - dose única). O controle negativo recebeu água por gavagem (0,6mL) durante 15 dias e salina por via intraperitoneal (0,3 mL – dose única). O grupo controle de poluente (CP) recebeu água por gavagem (0,6mL) durante 15 dias e o extrato orgânico da queima de cana-de-açúcar por via intraperitoneal (0,3mL – dose única). O grupo CV1 recebeu Tween 20 a 20% / Tween 80 a 6 % durante 15 dias por gavagem e ciclofosfamida intraperitoneal (0,3mL – dose única) e o grupo CV2 recebeu água por gavagem durante 15 dias e DMSO1% por via intraperitoneal, que foi inoculado em dose única. Os grupos teste receberam diferentes concentrações de extrato etanólico de *C. sylvestris* (3,9; 7,5 e 15,0 mg/kg) / casearina (0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg). Após 24 horas da administração i.p. de ciclofosfamida (controle positivo e controles de veículo) ou salina (controle negativo), e composto orgânico da queima de cana (grupos teste e controle de poluente), o sangue dos animais foi coletado por punção caudal e armazenado em capilares heparinizados. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da realização do ensaio do cometa. Para o teste do micronúcleo em medula óssea, foram retirados os fêmures dos

camundongos e, posteriormente, os animais foram sacrificados. A figura 4 apresenta delineamento experimental.

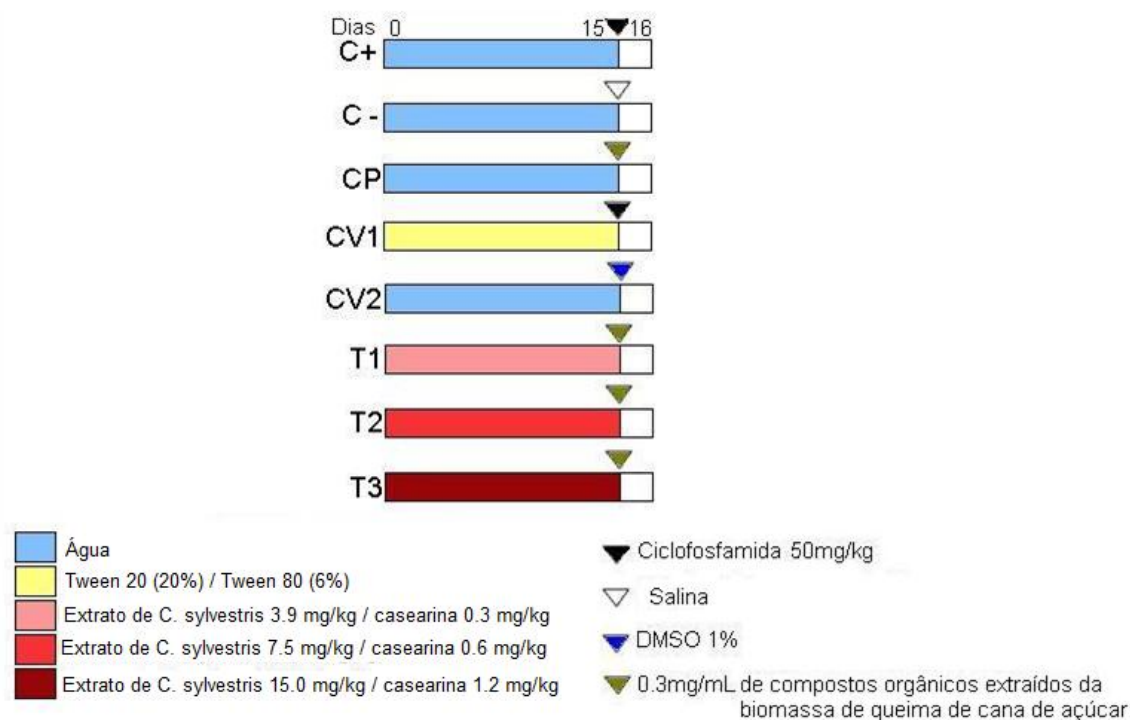


Figura 4: Esquema de tratamento pelo qual os camundongos foram submetidos para a avaliação de antígenotoxicidade e antimutagenicidade.

### 3.7.2. Ensaio do Cometa

Para a realização do Ensaio do Cometa, foi utilizado o protocolo estabelecido por Singh et al. em 1988.

As lâminas previamente limpas foram mergulhadas horizontalmente em agarose de ponto de fusão normal à temperatura de cerca de 60°C. Depois de secas, elas foram mantidas sob refrigeração. Foi preparada uma solução de lise, mantida sob refrigeração durante as duas horas anteriores à sua utilização, chegando a 4°C. Então, a agarose de

baixo ponto de fusão foi diluída em solução de PBS 10x, e transferida para o banho-maria a 37°C.

Os procedimentos que se seguem foram realizados em uma sala escura, sem a incidência direta de luz branca. Inicialmente, foram transferidos 20µL do sangue armazenado nos capilares heparinizados para um eppendorf e, posteriormente, foram adicionados 120µL de agarose de baixo ponto de fusão. Após homogeneização, o material obtido foi distribuído sobre a lâmina previamente preparada com agarose ponto de fusão normal e coberto delicadamente com lamínula (24 x 60 mm). Depois de permanecer durante cinco minutos sob refrigeração, a lamínula foi retirada e a lâmina, mergulhada em solução de lise, por uma noite, ao abrigo da luz e sob refrigeração.

Então, foi realizada eletroforese em uma cuba eletroforética envolvida em banho de gelo, mantendo-a a aproximadamente 4°C. As lâminas foram colocadas, uma a uma, na cuba de eletroforese. Foi adicionada à cuba a solução tampão de eletroforese (a 4°C) até total cobertura das lâminas, que ficaram durante 20 minutos em repouso para que houvesse o relaxamento das moléculas de DNA. A fonte de eletroforese foi regulada com 25 volts e a miliamperagem e potência foram reguladas de acordo com a quantidade de solução colocada na cuba. A eletroforese correu por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas com solução de neutralização durante 15 minutos e, logo após, mergulhadas em etanol 100% para fixação e secas a temperatura ambiente.

Foram utilizados 30 µL de solução de brometo de etídio por lâmina para realizar coloração das mesmas e, posteriormente, cada lâmina foi coberta com lamínula (24 x 60 mm). A leitura foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de

fluorescência com filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes, o que permite a visualização de imagens microscópicas com contorno circular, se não houver danos no DNA, ou estruturas em forma de cometa, em caso de ocorrência de danos no DNA. Foram capturadas imagens de 25 a 50 cometas por camundongo e posteriormente analisadas pelo software TriTek CometScore TM versão 1.5 (disponível gratuitamente no site: [www.autocomet.com](http://www.autocomet.com)). Através do software em questão, foi possível obter diversos parâmetros, sendo que o parâmetro considerado nas análises foi o “tail moment”, que é produto do comprimento da “cauda do cometa” *versus* a porcentagem de DNA contido na “cauda” (HARTMANN et AL, 2003).

### **3.7.3. Teste de micronúcleo**

Para a realização do teste do micronúcleo foram retirados, no momento do sacrifício, os fêmures dos animais dos grupos teste e controle. Então, as epífises proximais foram cortadas e a medula óssea foi removida de acordo com protocolo modificado por Zambrano et al.(1982). A medula óssea foi lavada e centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em soro fetal bovino concentrado. Em seguida, foi transferida uma gota do sedimento para uma lâmina previamente limpa e o esfregaço foi confeccionado por distensão e corado pelo método de May Grünwald- Giemsa. Foi realizada a leitura em microscópio óptico para avaliação da frequência de micronúcleos – ilustrado na figura 5 - em 1000 eritrócitos policromáticos de cada animal dos grupos testes e controles e da razão entre eritrócitos poli e normocromáticos em 200 células.





Figura 5: Micronúcleo (seta) em eritrócito policromático da medula óssea de camundongo Balb-C.

### 3.8. Porcentagem de inibição - Extrato etanólico de *C. sylvestris* e casearina U.

Para a determinação da atividade antimutagênica e antigenotóxica do extrato etanólico de *C. sylvestris* e da casearina U frente à indução dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar em células sanguíneas de camundongo, foi utilizada a seguinte expressão, proposta por Hosseinimehr e Karami, 2004:

$$\% \text{ inibição} = \frac{[\text{Controle Poluente}] - [\text{Grupo Teste}]}{[\text{Controle Poluente}]} \times 100$$

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise do Tail Moment (TM) para avaliação estatística do ensaio do cometa. As frequências de TM e outras frequências baseadas na cauda do

cometa não apresentaram distribuição normal, por isso foram aplicados testes não-paramétricos (Mann-Whitney) para a verificação de antigenotoxicidade através da comparação entre os grupos tratados e o grupo controle de poluente (BAUER et al., 1998). Para a avaliação da normalidade dos dados obtidos no teste do micronúcleo, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foram aplicados testes não-paramétricos (Mann-Whitney), já que os resultados de micronúcleo não apresentaram distribuição normal, sendo realizada a comparação entre os grupos teste e o grupo controle de poluente, para avaliação de efeito antimutagênico. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos resultados de citotoxicidade, do extrato etanólico e da casearina U, em eritrócitos de medula óssea que foram obtidos através da relação entre eritrócitos policromáticos (EPCs) e normocromáticos (ENCs). O nível de significância adotado para todas as comparações foi de 5%. Os testes foram realizados utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0 (Belém, PA, BR).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Coleta do Material Particulado Atmosférico Total – através de filtro (PTS)**

As concentrações de compostos orgânicos isolados de queima de cana-de-açúcar, bem como os potenciais efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos dos HPAs encontrados estão demonstrados na tabela 3. É possível observar que os HPAs encontrados durante o período de queima de cana-de-açúcar em elevada concentração, possuem atividade mutagênica ou carcinogênica.

Tabela 3: Concentração de HPA no material particulado atmosférico em suspensão (PTS) coletado durante a safra de queima de cana-de-açúcar e características mutagênicas e carcinogênicas desses HPAs.

HPA	Concentração no Material Particulado (ng/g)	Mutagenicidade (*)	Carcinogenicidade (*)
Acenaftileno	169,65	?	Não estudado
Antraceno	110,40	-	-
Benzo[a]antraceno	311,31	+	+
Benzo[a]pireno	1794,99	+	+
Benzo[e]acefenantrileno	4608,13	+	+
Benzo[g,h,i]perileno	3623,56	+	-
Criseno	713,99	+	+
Fenantreno	368,26	?	?
Fluoranteno	841,17	+	+
Indeno[1.2.3-cd]pireno	1118,69	+	+
Pireno	3211,60	?	?

+ positivo, - negativo, ? questionável.

\*Retirado de World Health Organization, 1998.

## 5.2. *Casearia sylvestris*

### 5.2.1 Avaliação da atividade antígeno-tóxica do extrato etanólico de *C. sylvestris* através do ensaio do Cometa

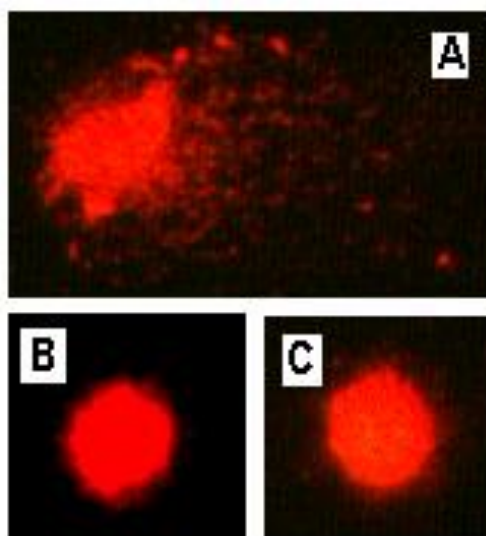


Figura 6: Análise do cometa. A) Controle de poluente, B) Controle Negativo e C) Grupo tratado com *C. sylvestris* 3,9 mg/kg. As demais concentrações apresentaram o mesmo perfil de cometa apresentado em C) e não foram demonstradas nessa figura.

O resultado da avaliação do efeito antígeno-tóxico do extrato etanólico da *C. sylvestris* frente aos danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar estão demonstrados na Tabela 4. Na figura 6 é possível verificar a diferença dos perfis de “cometas” entre os diferentes grupos testados. Observou-se diferença significativa entre os grupos Controle Positivo (C+) e Controle Negativo (C-) ( $p < 0,0005$ ). Houve também diferença significativa entre o Controle de Veículo1 (Cv1) e o Controle Negativo (C-), o que demonstra que o veículo Tween 20 a 20% não apresentou efeito antígeno-tóxico. Não houve diferença estatística

entre o Controle de Veículo2 (CV2) e o Controle Negativo (C-), indicando que o DMSO 1% não apresentou efeito genotóxico. Não ocorreu significância entre o Controle de Poluente (CP) e o Controle Positivo (C+), demonstrando o efeito genotóxico do extrato orgânico da biomassa de queima de cana-de-açúcar. O Controle de Poluente (CP) apresentou diferença estatística em relação ao Controle Negativo (C-) ( $p < 0,0005$ ), Finalmente, foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com extrato etanólico de *C. sylvestris* nas concentrações 3,9 ( $p < 0,0005$ ), 7,5 ( $p < 0,005$ ) e 15,0 mg/kg ( $p < 0,0005$ ), indicando que o extrato etanólico apresentou atividade antígenotóxica em tais concentrações. Na figura 7 estão demonstradas as porcentagens de inibição extrato etanólico de *C. sylvestris*. A análise revela que todas as concentrações de *C. sylvestris* exerceram efeito antígenotóxico aos danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

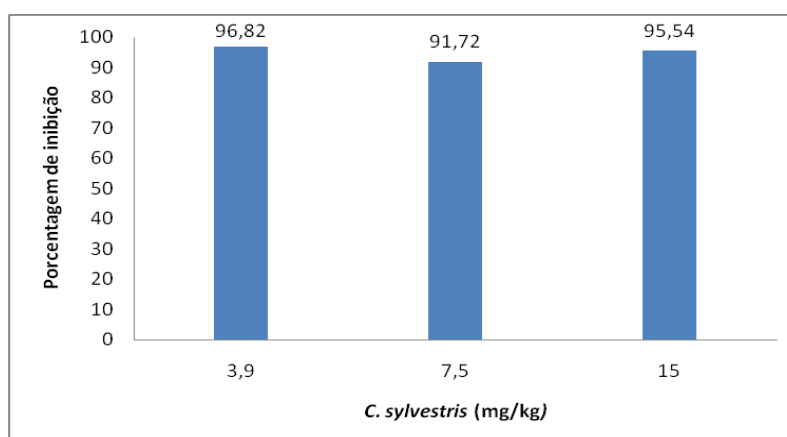


Figura 7 : Inibição (%) do efeito genotóxico observado no tratamento com extrato etanólico de *Casearia sylvestris* nas concentrações de 3,9; 7,5 e 15,0 mg/kg ao efeito genotóxico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

Tabela 4: Avaliação de antigenotoxicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris* através do Ensaio do Cometa.

Tratamentos	Cometa
	(Tail Moment) Média±EP
Controle Positivo	1,77±0,302 <sup>a</sup>
Controle Negativo	0,12±0,074 <sup>b</sup>
Controle de Veículo 1(Tween 20)	2,85±0,357 <sup>c</sup>
Controle de Veículo 2(DMSO)	0,03±0,004 <sup>b</sup>
Controle de Poluente	1,57±0,358 <sup>a</sup>
<b>Grupos Teste tratados com extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i></b>	
3.9 mg/kg	0,05±0,012 <sup>b</sup>
7.5 mg/kg	0,13±0,035 <sup>b</sup>
15.0 mg/kg	0,07±0,019 <sup>b</sup>

EP (Erro padrão), EPC (eritrócito policromático) e ENC (eritrócito normocromático).

### 5.2.2 Avaliação da atividade antimutagênica do extrato etanólico de *C. sylvestris* através do teste do Micronúcleo

O resultado da avaliação do efeito antimutagênico do extrato etanólico da *C. sylvestris* frente aos danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar estão demonstrados na Tabela 5. Foi observada diferença significativa entre os grupos Controle Positivo (C+) e Controle Negativo (C-) ( $p < 0,01$ ). Houve também diferença significativa entre o Controle de Veículo1 (Cv1) e o Controle Negativo (C-), indicando que o veículo Tween 20 a 20% não apresentou efeito antimutagênico. Não houve diferença estatística entre o Controle

de Veículo2 (CV2) e o Controle Negativo (C-), indicando que o DMSO 1% não apresentou efeito mutagênico. Não ocorreu significância entre o Controle de Poluente (CP) e o Controle Positivo (C+), demonstrando o efeito mutagênico do extrato orgânico da biomassa de queima de cana-de-açúcar. Finalmente, foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com extrato etanólico de *C. sylvestris* nas concentrações 3,9 mg/kg ( $p < 0,01$ ), 7,5 mg/kg ( $p < 0,01$ ) e 15,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ), indicando que o extrato etanólico apresentou atividade antimutagênica em tais concentrações. Na figura 8 estão demonstradas as porcentagens de inibição de mutagenicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris*. A análise revela que as concentrações 3,9; 7,5 e 15,0 mg/kg de *C. sylvestris* exerceram efeito antimutagênico frente ao danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

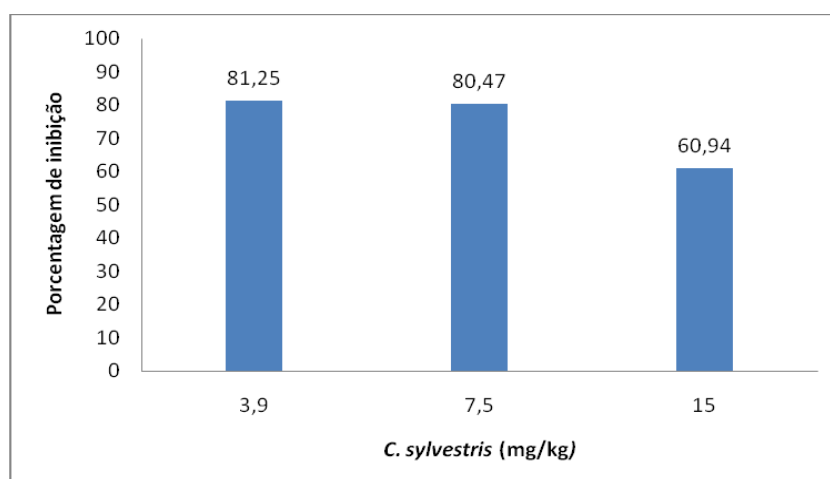


Figura 8 : Inibição (%) do efeito de formação de micronúcleo observado no tratamento com extrato etanólico de *Casearia sylvestris* nas concentrações de 3,9; 7,5 e 15,0 mg/kg, frente ao efeito mutagênico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

### 5.2.3. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris*

Na tabela 5 está demonstrado o resultado da avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris*, realizada no ensaio de antimutagenese. Não foi observada diferença estatística entre as quantidades de eritrócitos policromáticos (EPCs) e eritrócitos normocromáticos (ENCs) entre os grupos. Esses resultados possivelmente indicam que a redução do número de micronúcleos esteja relacionada à proteção contra danos no DNA e não à lise celular associada à citotoxicidade.

Tabela 5: Avaliação de antimutagenicidade e citotoxicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris* através do teste do micronúcleo.

Tratamentos	EPC/ENC	MN(%)
	Média±EP	Média±EP
Controle Positivo	0,98±0,05	2,7±0,403 <sup>a</sup>
Controle Negativo	0,96±0,03	1,0±0,269 <sup>b</sup>
Controle de Veículo 1(Tween 20)	0,95±0,12	5,53±0,733 <sup>c</sup>
Controle de Veículo 2(DMSO)	0,87±0,07	0,71±0,159 <sup>b</sup>
Controle de Poluente	0,99±0,05	2,56±0,395 <sup>a</sup>
<b>Grupos Teste tratados com extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i></b>		
3,9 mg/kg	1,07±0,11	0,48±0,161 <sup>b</sup>
7,5 mg/kg	0,89±0,07	0,50±0,118 <sup>b</sup>
15,0 mg/kg	0,99±0,05	1,00±0,365 <sup>b</sup>

EP (Erro padrão), EPC (eritrócito policromático) e ENC (eritrócito normocromático)



### 5.3. Casearina U

#### 5.3.1 Avaliação da atividade antigenotóxica da Casearina U através do ensaio do Cometa

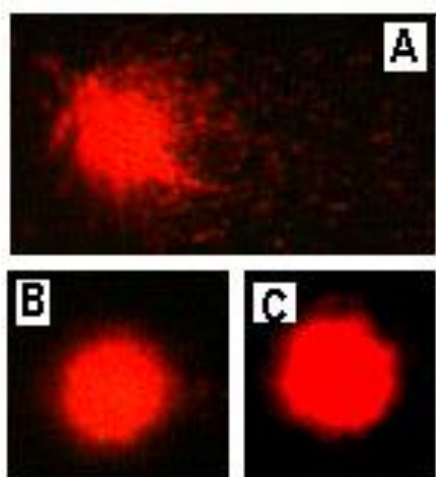


Figura 9: Análise do cometa. A) Controle de poluente, B) Controle Negativo e C) Grupo tratado com Casearina U 0,3mg/kg. As demais concentrações apresentaram o mesmo perfil de cometa apresentado em C) e não foram demonstradas nessa figura.

O resultado da avaliação do efeito antigenotóxico da substância pura casearina U frente aos danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar estão demonstrados na Tabela 6. A figura 9 demonstra a diferença de perfis de “cometa” entre os grupos testados. Foi observada diferença significativa entre os grupos Controle Positivo (C+) e Controle Negativo (C-) ( $p < 0,0005$ ). Não houve diferença significativa entre o Controle de Veículo1 (Cv1) e o Controle de Poluente (CP), indicando que o veículo Tween 80 a 6% não apresentou efeito

antigenotóxico. Não houve diferença estatística entre o Controle de Veículo<sup>2</sup> (CV2) e o Controle Negativo (C-), indicando que o DMSO 1% não apresentou efeito genotóxico. Não ocorreu significância entre o Controle de Poluente (CP) e o Controle Positivo (C+), demonstrando o efeito genotóxico do extrato orgânico da biomassa de queima de cana-de-açúcar. Houve significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e o Controle Negativo (C-) ( $p < 0,0005$ ), e foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com Casearina U nas concentrações 0,3 mg/kg ( $p < 0,0005$ ), 0,6 mg/kg ( $p < 0,0005$ ) e 1,2 mg/kg ( $p < 0,001$ ).

Na figura 10 estão demonstradas as porcentagens de inibição de genotoxicidade da casearina U. A análise revela que todas as concentrações exerceram efeito antigenotóxico aos danos ocasionados pelos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

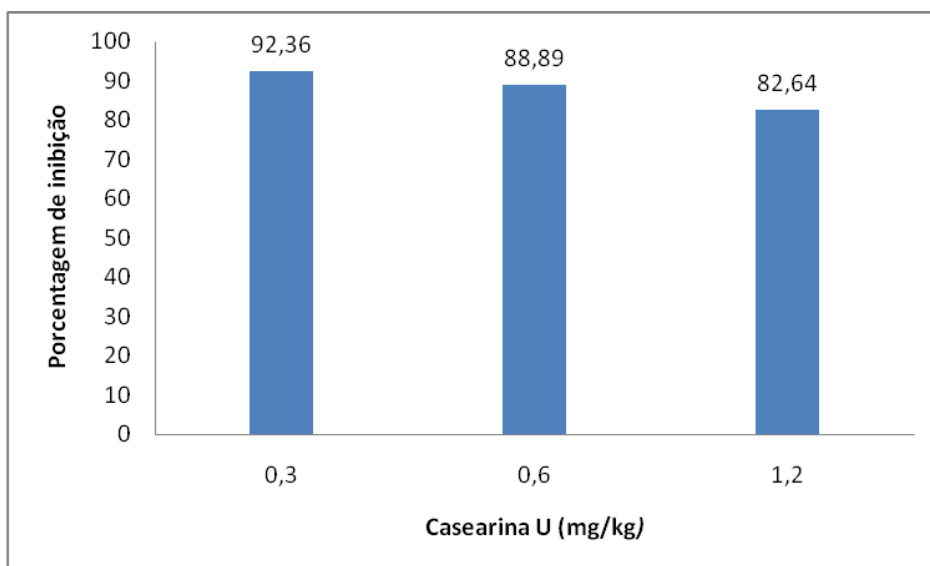


Figura 10: Inibição (%) do efeito genotóxico observado no tratamento com casearina U nas concentrações de 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg ao efeito genotóxico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

Tabela 6: Avaliação de antigenotoxicidade da Casearina U através do Ensaio do Cometa.

Tratamentos	Cometa(Tail Moment)
	Média±EP
Controle Positivo	1,59±0,337 <sup>a</sup>
Controle Negativo	0,10±0,032 <sup>b</sup>
Controle de Veículo 1(Tween 80)	1,59±0,381 <sup>a</sup>
Controle de Veículo 2 (DMSO)	0,05±0,012 <sup>b</sup>
Controle de Poluente	1,44±0,228 <sup>a</sup>
<b>Grupos Teste tratados com Casearina U</b>	
0.3 mg/kg	0,11±0,023 <sup>b</sup>
0.6 mg/kg	0,16±0,047 <sup>b</sup>
1.2 mg/kg	0,25±0,114 <sup>b</sup>

EP (Erro padrão), EPC (eritrócito policromático) e ENC (eritrócito normocromático)

### 5.3.2 Avaliação da atividade antimutagênica da Casearina U através do teste do Micronúcleo

Os resultados de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos estão demonstrados na Tabela 7. Houve diferença significativa entre os grupos Controle Positivo (C+) e Controle Negativo (C-) ( $p < 0,0005$ ). Houve também diferença significativa entre o Controle de Veículo1 (Cv1) e o Controle Negativo (C-), o que demonstra que o

veículo Tween 80 a 6% não apresentou efeito antimutagênico. Não houve diferença estatística entre o Controle de Veículo2 (CV2) e o Controle Negativo (C-), indicando que o DMSO 1% não apresentou efeito mutagênico. Não ocorreu significância entre o Controle de Poluente (CP) e o Controle Positivo (C+), demonstrando o efeito mutagênico do extrato orgânico da biomassa de queima de cana-de-açúcar. Não foi observada significância entre o grupo Controle de Poluente (CP) e os grupos teste tratados com a substância pura casearina U nas concentrações 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg, indicando que a substância pura casearina U não apresentou atividade antimutagênica em nenhuma concentração testada.

Na figura 11 estão demonstradas as porcentagens de inibição de antimutagenicidade da Casearina U. A análise revela que as concentrações testadas não apresentaram inibição significativa.

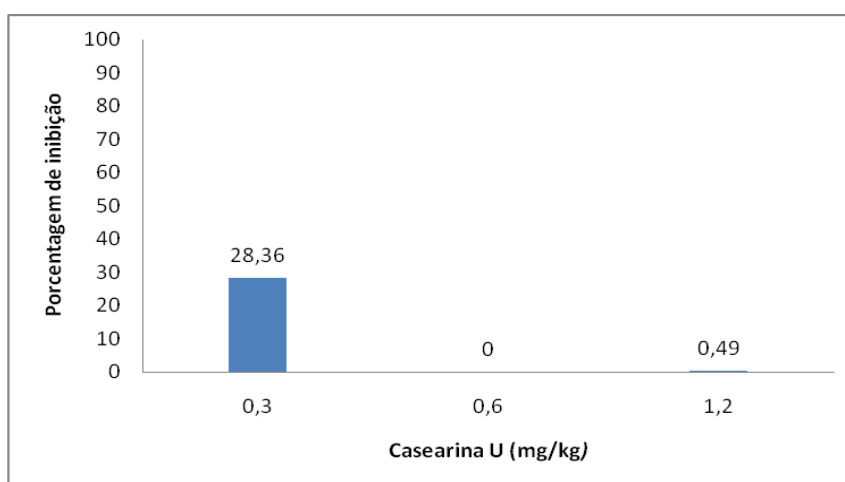


Figura 11: Inibição (%) do efeito de formação de micronúcleo observado no tratamento com a substância pura casearina U nas concentrações de 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg, frente ao efeito mutagênico dos compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

### 5.3.3. Avaliação da citotoxicidade da Casearina U

Na tabela 7 estão demonstrados os resultados da avaliação da citotoxicidade da substância pura casearina U realizado nos ensaios de antimutagênese. Não foi observada diferença estatística entre as quantidades de eritrócitos policromáticos (EPCs) e eritrócitos normocromáticos (ENCs) entre os grupos, indicando que nessas concentrações não houve presença de citotoxicidade.

Tabela 7: Avaliação de antimutagenicidade e citotoxicidade da Casearina U através do Teste do Micronúcleo.

Tratamentos	EPC/ENC	MN(%)
	Média±EP	Média±EP
Controle Positivo	0,99±0,02	2,63±0,324 <sup>a</sup>
Controle Negativo	1,00±0,01	0,37±0,117 <sup>b</sup>
Controle de Veículo 1(Tween 80)	1,02±0,01	2,73±0,361 <sup>a</sup>
Controle de Veículo 2 (DMSO)	1,02±0,01	0,30±0,092 <sup>b</sup>
Controle de Poluente	1,01±0,04	2,23±0,372 <sup>a</sup>
<b>Grupos Teste tratados com Casearina U</b>		
0,3 mg/kg	1,02±0,02	1,60±0,163 <sup>a</sup>
0,6 mg/kg	1,00±0,02	2,23±0,158 <sup>a</sup>
1,2 mg/kg	0,99±0,01	2,20±0,133 <sup>a</sup>

EP (Erro padrão), EPC (eritrócito policromático) e ENC (eritrócito normocromático)

## 6. DISCUSSÃO

Diversas plantas da flora brasileira têm sido estudadas com o objetivo de se encontrar novas atividades terapêuticas. Muitas espécies que já possuem uso popular bastante difundido têm provocado o interesse de muitos pesquisadores em avaliar se tais plantas apresentam atividades farmacológicas comprovadas, uma dessas espécies é a *Casearia sylvestris*. Assim, é significativo o número de trabalhos que descrevem variadas ações de *Casearia sylvestris*, como antioxidante (MENEZES et al., 2004), antiofídico (BORGES et al., 2001), antiúlcera (BASILE et al., 1990; SERTIÉ et al., 2005), antiséptico e cicatrizante em doenças da pele (HOEHNE, 1939), antinociceptivo (MATTOS et al., 2007), anestésico de uso tópico (ORBELIES et al., 2002), agente antitumoral (ITOKAWA et al., 1990), anticâncer (BOLZANI et al., 1999; ORBELIES et al., 2002), atividade citotóxica em células tumorais (MAISTRO et al., 2004), fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO et al., 1998) e *Aspergillus niger* (ORBELIES et al., 2002), formas promastigotas de *Leishmania donovani* (MESQUITA et al., 2005), amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006).

Entretanto, não há estudos, segundo nosso conhecimento, que verificaram a atividade antimutagênica do extrato etanólico extraído das folhas de *C. sylvestris*. Há um estudo que mostrou que o óleo essencial extraído da *C. sylvestris* apresentou atividade anticlastogênica em células de hepatoma (HTC) (SOUSA et al., 2007). Além disso, do extrato de *C. sylvestris* é possível isolar substâncias puras denominadas casearinas, que pertencem à classe dos diterpenos cloredânicos. Alguns estudos mostram diversas propriedades farmacológicas de diterpenos cloredânicos, como

atividade anticonvulsivante (DALÓ et al., 2007), inibição da enzima transcriptase reversa no vírus HIV (CIRNE-SANTOS et al., 2007), atividade citotóxica em células tumorais (GARBARINO et al., 2007), e ainda, atividade antimutagênica (AGNER et al., 2001; POERSCH et al., 2007) entre outras. Porém, segundo nosso conhecimento, diterpenos cloredânicos isolados de *C. sylvestris* ainda não foram estudados com relação às suas possíveis propriedades protetoras ao DNA frente aos danos causados por compostos orgânicos extraídos da biomassa de queima de cana-de-açúcar.

A forte relação entre a exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e a carcinogenicidade foi descoberta há aproximadamente 35 anos (LACASSAGNE et al., 1968; MASUDA e KAGAWA, 1972). Os epóxidos e dióis epóxidos, metabólitos mutagênicos resultantes dos HPAs, ligam-se ao DNA por meio de uma ligação covalente entre o carbono benzílico do grupo epóxido e os sítios nucleófilos básicos do DNA (nitrogênio das bases pirimidícas dos ácidos nucleicos), e presume-se ser este o início do evento carcinogênico (BAREK et al., 1994). Devido à presença desses compostos no ambiente (biomassa da queima de cana-de-açúcar, exaustão de combustíveis de veículos, fumaça de cigarro), eles têm atraído a atenção de pesquisadores (SCHOBER et al., 2006).

Segundo ANDRADE et al (2010), durante a safra de cana-de-açúcar, a concentração de material particulado  $PM_{10}$  atmosférico é cerca de três vezes maior do que no período de entressafra e a concentração de alguns HPAs pode ser quatro vezes maior durante a safra. Dentre os HPAs mais abundantes encontrados no material particulado atmosférico em suspensão (PTS) de queima de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo, destaca-se a presença de Fenantreno, Fluoranteno e Pireno, que são

os HPAs mais gerados durante o período de queima de cana-de-açúcar (Simoneit et al., 2006; Azevedo et al., 2002), sendo que o Pireno ainda é considerado um marcador de queima de gramas (ANDRADE et al., 2010).

Dentre os HPAs encontrados no presente estudo Fluoranteno, Benzo[a]antraceno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Benzo[a]pireno, Benzo[e]acefenantrileno e Criseno apresentam atividade mutagênica e carcinogênica, de acordo com World Health Organization, 1998. Como a exposição a tais agentes é frequentemente inevitável, há um interesse na descoberta de agentes antimutagênicos contra mutágenos e carcinógenos ambientais (HEO et al, 2001).

O aumento do número de células contendo micronúcleos, detectados através do teste do micronúcleo, pode ser considerado um biomarcador de efeitos que podem corresponder à exposição a agentes aneugênicos e/ou clastogênicos (ALBERTINI et al., 2000), sendo um indicador de danos irreversíveis ao DNA. Já através do ensaio do cometa, é possível detectar danos de DNA recentes e ainda passíveis de serem reparados (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; MOLLER, 2005). Assim, no presente estudo utilizou-se das duas técnicas, visando a complementação dos resultados, tornando-os assim mais abrangentes e consistentes.

Foi constatada a atividade antigenotóxica e antimutagênica do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* frente à biomassa extraída da queima de cana-de-açúcar. Ao analisar a resposta inibitória do extrato etanólico de *C. sylvestris*, foi possível observar que o mesmo mostrou-se eficaz na inibição de danos, em todas as concentrações testadas. Esses resultados indicam que nas concentrações testadas, o extrato poderia ter ação sobre determinados alvos intracelulares, como por exemplo, através da



proteção ao DNA (MAURYAA et al.,2007), proteção das células contra os danos oxidativos (SLIWINSKI et al., 2007; TOBERGSEN e COLLINS, 2000), ou ainda, da ativação do sistema de reparo (COLLINS e HARRINGTON, 2007, ZHANG et al., 2007).

Ao avaliar a ação da Casearina U, verificou-se também ação antígenotóxica, em todas as concentrações testadas, frente aos efeitos genotóxicos da biomassa extraída da queima de cana-de-açúcar. No entanto, a Casearina U, apesar de ser uma das moléculas mais abundantes do extrato etanólico de *Casearia sylvestris*, não apresentou efeito antimutagênico significativo, o que nos leva a crer que tal molécula só possui ação protetora para os danos primários, ainda passíveis de reparo.

Assim, de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, verificamos que o efeito antimutagênico demonstrado pelo extrato etanólico de *Casearia sylvestris*, possivelmente seja devido a um sinergismo entre os diterpenos cloredânicos presentes na composição do extrato etanólico, não havendo evidências de que seja um diterpeno cloredânico isolado o responsável por tal efeito. Por outro lado, seria interessante testar maiores concentrações da molécula isolada, visando avaliar se nesse caso seria possível alcançar o efeito antimutagênico esperado.

## 7. CONCLUSÕES

1) Foi possível observar efeito antigenotóxico e antimutagênico do extrato etanólico de *C. sylvestris* nas concentrações de 3,9; 7,5 e 15,0 mg/kg, frente aos danos ocasionados pelo extrato orgânico de queima de cana-de-açúcar, através , respectivamente, do ensaio do cometa em células do sangue periférico de camundongo, e do teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongo.

2) Foi possível observar efeito antigenotóxico, mas não foi possível observar o efeito antimutagênico, da substância pura casearina U nas concentrações de 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg, frente ao efeito, respectivamente, genotóxico e mutagênico do extrato orgânico de queima de cana-de-açúcar, através do ensaio do cometa (células do sangue periférico) e micronúcleo (células de medula óssea) em camundongos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.J. - Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em urina. Dissertação (mestrado).

**IQ/UNESP**, 2000, 80pp

ANDRADE, S. J.; CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; ZOCCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R.

Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil.

**Atmospheric Environment**, v.44, p. 2913–2919, 2010.

AGNER, A.R.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; COLUS, I.M. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 67 (9) p. 815-819, 2001.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v.463, p. 111-172, 2000.

AZEVEDO, D.A.; SANTOS, C.Y.M.; AQUINO NETO, F.R. Identification and seasonal

variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil.

**Atmospheric Environment**, v.36, p. 2383 - 2395, 2002.

BARBOSA, J.M.; RÉ-POPPI, N.; SANTIAGO-SILVA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons from wood pyrolysis in charcoal production furnaces. **Environ Res.**, v. 101 (3), p. 304-311, 2006.

BAREK, J.; MEJSTRIK, V.; SVAGROVA, I. Chemické Listy, v. 88, n. 6, p. 341-352, 1994.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. In: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 30 , p. 185-197, 1990.

BAUER, E; RECKNAGEL, R.; FIEDLER, U.; WOLLWEBER, L.; BOCK, C.; GREULICH, K. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (Comet assay) obeys a Chi-square ( $\chi^2$ ) not a Gaussian distribution, **Mutat. Res.**, v. 398, p. 101–110, 1998.

BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.; LOPES, M.N. Search for antifungal and anticancer compounds from native

plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **An Acad Bras Cienc.** v.71 (2), p.181-187, 1999.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon.** v.39 (12), p.1863-1869, 2001.

BRENDLER-SCWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

BUSCHINI, A.; CASSONI, F.; ANCESCHI, E.; PASINI, L.; POLI, P.; ROSSI, C. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis test on microorganisms and comet assay. **Chemosphere.** v.44, p.1723-1736, 2001.

CARIÑO-CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; TORRES-VALENCIA, J.M.; GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicol. Vitro**, v. 21, p. 691–697, 2007.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. da S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpene against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 549-556, 2001.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1, 2, 4 – benzenetriol. **Mutation Research**, v. 516, n. 1-2, p. 49-56, 2002.

CIRNE-SANTOS, C. C.; SOUZA, T. M. L.; TEIXEIRA, V. L.; FONTES, C. F. L.; REBELLO, M. A.; CASTELLO-BRANCO, L. R. R.; ABREU, C. M.; TANURI, A.; FRUGULHETTI, I. C.P.P.; BOU-HABIB, D.C. The dolabellane diterpene dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. **Antiv. Research**, In Press, Corrected Proof, 2007.

COLLINS, A.; HARRINGTON, V. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. **Mutagenesis**, v. 17 (6), p. 489-493, 2002.

COZZI, R., RICORDY, R., AGLITTI, T., GATTA, V., PERTICONE, P., DE SALVIA, R. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 223-228, 1997.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 1, p. 105-126, 1999.

CURY, P.M.; LICHTENFELS, A.J.; REYMÃO, M.S.; CONCEIÇÃO, G.M.; CAPELOZZI, V.L.; SALDIVA, P.H. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumours in mice. **Pathol Res Pract**. v.196(9), p. 627-633, 2000.

DALO, N.L.; SOSA-SEQUERA, M.C.; USUBILLAGA, A. On the anticonvulsant activity of kaurenic acid. **Invest. Clin.**, v. 48(3), p. 349-358, 2007.

DHIR, H., KUMAR, A., SHARMA, A. Relative efficiency of Phyllanthus emblica fruit extract and ascorbic acid in modifying lead and aluminium-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 21, p. 229-236, 1993.

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-ray. **Mutagenesis**, v. 18, n. 5, p. 439-43, 2003.

DOCKERY, D.W.; POPE, C.A. Acute respiratory effects of particulate air pollution. **Annu Rev Public Health**. v. 15, p. 107-132, 1994.

EDENHARDER, R.; SAGER, W.J.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PLATT, L.K. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and Xavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminoXuorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhPI) in metabolically competent V79 cells. **Mutat. Res.**, v. 521, p. 57–72, 2002.

ESCRIVÁ, C. et al. Comparison of 4 methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne-particulates. **Journal of Chromatography, A**, v. 676, n. 1, p. 375-388, 1994.

EVANS, H.J.; NEARLY, G.J.; WILLIAMSON, F.S. The relative biological effiencie of single doses of fast neutrons and gamma rays in Vicia faba roots and the effects of oxygen: Part II. Chromossome damage; the production of micronuclei. **Int. J. Rad. Biol.**, v. 1, p. 230-240, 1959.



FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FINE, P.; GRABER, E.R.; YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: Abiotic processes. **Soil Technology**, Amsterdam, v.10, p.133-153, 1997.

GARBARINO, J.A.; CARDILE, V.; LOMBARDO, L.; CHAMY, M.C.; PIOVANO, M.; RUSSO, A. Demalonyl thyriflorin A, a semisynthetic labdane-derived diterpenoid, induces apoptosis and necrosis in human epithelial cancer cells. **Chem.-Biol. Interac.**, v. 169 (3), p. 198-206, 2007.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v.18, p.45-51, 2003.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat Res**, v. 18(2), p. 187-190, 1973.

HEO, M.Y.; SOHN, S.J.; AU, W.W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. **Mutat Res**, v. 488(2), p. 135-150, 2001.

HOEHNE, F.C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Graphics, São Paulo, Brasil, 1939.

HOSSEINIMEHR, S.J.; KARAMI, M. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 505-509, 2004.

IKUMA, N.E.M.; PASSONI, H.M.; BISO, I.F.; LONGO, C.M.; CARDOSO, P.R.C.; CAMPANER, S.L.; VARANDA, A.E. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxic. in Vitro**, v. 20, p. 361–366, 2006.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA N.; MORITA, H.; TAKEDA, E.; IITAKA, Y., SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**,v. 38, p.3384, 1990.

JEONG, T.J.; MOON, J.-H.; PARK, K.H.; SHIN, S.CH. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2123–2128, 2006.

LACASSAGNE A, BUU-HOŨY NP, ZAJDELA F, VIGNIELLO F. The true dibenzo[a,l]pyrene, a new, potent carcinogen. **Naturwissenschaften**. v. 55 (1), p.43, 1968.

LEWTAS J, LEWIS C, ZWEIDINGER R, STEVENS R, CUPITT L. Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air. **Pharmacogenetics**.v.2(6), p.288-96, 1992.

LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; SUGUI, M.M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F., SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutat. Res.**, v. 496, p. 23-32, 2001.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J.C.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of *Casearia sylvestris* extract and V79 cells by the comet assay. **Toxicol. in Vitro**, v. 18, p.337-342, 2004.

MANSOUR, H.B.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; MAHMOUD, A.; BERNILLON, S.; CHIBANI, J.B.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic activities of crude extracts from *Acacia salicina* leaves. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 48(1), p. 58-66, 2007.

MASUDA Y, KAGAWA R. A novel synthesis and carcinogenicity of dibenzo[a,l]pyrene, **Chem. Pharm. Bull.** v.20, p.2736–2737, 1972.

MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S.; COLLE, T.D.; PIERI, D.V.; PETERS, R.R.; PIOVEZAN, A.P.. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Jour. Ethnopharm.**, v. 112, p. 1–6, 2007.

MAURYAA, D.K.; ADHIKARI, S.; NAIR, C.K.K.; DEVASAGAYAM, T.P.A. DNA protective properties of vanillin against  $\gamma$ -radiation under different conditions: Possible mechanisms. **Mutat. Res.**, v. 634, p. 69-80, 2007.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398–400, 2004.

MERWE JD, JOUBERT E, RICHARDS ES, MANLEY M, SNIJMAN PW, MARNEWICK JL, GELDERBLOM WC. A comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. **Mutat Res.** v.611(1-2), p.42-53, 2006.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 783–787, 2005.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutat. Res.**, v. 512, p. 135–153, 2002

MOLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic Clinical Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 336–345, 2005.

MORITA, H.; TAKEYA, K.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M.; KOJIMA, M.; NAKAYAMA, H.; ITOKAWA, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, p. 693, 1991.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat Res.**, v. 117(1), p. 79-92, 1989.

ORBELIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI,

M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*, **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 95-99, 2002.

PERON, M.C.C., Avaliação de mutagenicidade, citotoxicidade e expressão de proteínas relacionadas a apoptose, bak, bcl-2 e p53 fosforilado, em células tratadas com fuligem e particulado total de queima de cana-de-açúcar, Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em análises clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2006

POERSCH, A.; SANTOS, F.V.; MACIEL, M.A.M.; CÂMARA, J.K.P.; DANTAS, T.N.C., C´OLUS, I.M.S. Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. **Mutat. Res.**, v. 629, p. 14–23, 2007.

RODEIRO, I.; CANCINO, L.; GONZÁLES, J.E.; MORFFI, J.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, R.M.; NUÑEZ, A.; DELGADO, R. Evaluation of genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vinang), a new natural product with antioxidant activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1707-1713, 2006.

RODGERS BE, CHESSER RK, WICKLIFFE JK, PHILLIPS CJ, BAKER RJ. Subchronic exposure of BALB/c and C57BL/6 strains of *Mus musculus* to the radioactive environment of the Chornobyl, Ukraine exclusion zone. **Environ Toxicol Chem.** v.20(12), p.2830-5, 2001.

RODRIGUES, A.M.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, 314–317, 2006.

SANTOS, A. G. Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intra-específica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

SCARPATO R, DI MARINO F, STRANO A, CURTI A, CAMPAGNA R, LOPRIENO N, BARRAI I, BARALE R. Two years' air mutagenesis monitoring in a northwestern rural area of Italy with an industrial plant. **Mutat Res**. v.319(4), p.293-301, 1993.

SCHOBER W, LUCH A, SOBALLA VJ, RAAB G, STEGEMAN JJ, DOEHMER J, JACOB J, SEIDEL A. On the species-specific biotransformation of dibenzo[a,l]pyrene. **Chem Biol Interact**. v.161(1), p.37-48, 2006.

SCHWARTZ J. Particulate air pollution and chronic respiratory disease. **Environ Res**. v.62(1), p.7-13, 1993.

SERTIÉ, J.A.A.; CARVALHO, J.C.T.; PANIZZA, S., Antiulcer activity of the crude extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharm. Biol.**, v. 38, p. 112-119, 2000.

SIMONEIT, B.R.T.; RAHMAN, N.A.; OMAR, N.Y.M.J.; ABAS, R.B.; OROS, D.R.  
Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning: part 3. Grasses. **Applied Geochemistry**, v.21, p. 919-940, 2006.

SLIWINSKI, T.; ROZEJ, W.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; REITER, R.;  
BLASIAK, J. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage—Chemical inactivation versus base-excision repair. **Mutat. Res.**, v. 634, p. 220-227, 2007.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOARES, S.R.C.; BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; RIVERO, D.H.R.F.;  
DE CASTRO, I, GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. **Environ. Res.** v. 92, p.191-196, 2003.



SUGUI, M.M.; ALVES, P.L.L.; DELMANTO, R.D.; DA EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 555-560, 2003.

TAO S, CUI YH, XU FL, LI BG, CAO J, LIU WX, SCHMITT G, WANG XJ, SHEN WR, QING BP, SUN R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. **Sci Total Environ.** v.320(1), p.11-24, 2004.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35(3):206-221, 2000.

TININIS, A. G. Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw. 2006. 182f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

TOBERGSEN, A.C.; COLLINS, A.R. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. **Eur. J. Nutr.**, v. 39, p. 80-85, 2000.

TOROUS DK, DERTINGER SD, HALL NE, TOMETSKO CR. An automated method for discriminating aneugen- vs. clastogen-induced micronuclei. **Environ Mol Mutagen.** v.31(4), p.340-4, 1998.

VANPARYS P, DEKNUDT G, VERMEIREN F, SYSMANS M, MARSBOOM R. Sampling times in micronucleus testing. **Mutat Res.** v.282(3), p.191-6, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Health Critéria.** v.202, p.883, 1998.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H.J.; RABELLO-GAY, M.N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain. Tech.**, v. 57, p 48-49, 1982.

ZAMPERLINI, G. C. M. Identificação da fuligem proveniente da cana-deaçúcar com ênfase nos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). 1997. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

ZHANG, Y.; CARR, T.; DIMTCHEV, A.; ZAER, N.; DRITSCHILO, A.; JUNG, M.  
Attenuated DNA Damage Repair by Trichostatin A through BRCA1 Suppression.  
**Radiat. Res.**, v. 168, p. 115-124, 2007.