



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**THAÍS BERNARDES DE QUEIROZ**

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO  
GERANIOL EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE  
PERIFÉRICO E DE HEPATOCARCINOMA HUMANO HepG2**

**BOTUCATU – SP  
2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO  
GERANIOL EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE  
PERIFÉRICO E DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

**THAÍS BERNARDES DE QUEIROZ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e  
Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas:  
estrutura e função*.

*Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Queiroz, Thaís Bernardes de.

Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico e de hepatocarcinoma humano (HepG2) / Thaís Bernardes de Queiroz. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edson Luis Maistro  
Capes: 20206003

1. Fígado - Câncer. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Citotoxicidade. 4. Toxicologia genética. 5. Ensaio cometa. 6. Teste de materiais.

Palavras-chave: Ensaio do Cometa; Geraniol; MTT; Micronúcleo; Monoterpeno.

**THAÍS BERNARDES DE QUEIROZ**

ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO GERANIOL  
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E DE  
HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e  
Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas:  
estrutura e função*.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Marília/SP

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini

Universidade do Sagrado Coração (USC) – Bauru/SP

Prof. Dr. José Maurício Sforcin

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP

Botucatu, 20 de fevereiro de 2017.

*Dedico este trabalho a minha família, especialmente meus pais, Divino e Maria, minha base e principais incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional.*

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu forças e capacidade para a realização deste trabalho, mais uma importante etapa da minha vida. Obrigada, Senhor, por sempre estar ao meu lado e a cada dia renovar minhas energias para que eu continue a perseverar.*

*Aos meus pais, Divino e Maria, que sempre me deram o apoio necessário à minha formação. Só posso agradecer imensamente o amor incondicional de vocês, por me escutarem atentamente, mesmo quando não entendiam o que eu contava sobre o meu projeto, e por sempre torcerem pela minha felicidade e sucesso. Estejam certos de que essa conquista não é apenas minha, mas de vocês também.*

*Estendo esses mesmos agradecimentos aos meus irmãos, Rodrigo e Júnior, meus eternos companheiros e melhores amigos. E ao meu namorado, Tales Valvassori, que me escuta pacientemente, apoia e incentiva. Obrigada por seu amor e por sua compreensão diante de nosso reduzido tempo juntos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luis Maistro, pela confiança em me orientar e em meu trabalho dentro do laboratório ao longo desses meses. Obrigada por todas as oportunidades que me foram dadas.*

*Ao pessoal do laboratório CEPEN (Ana Decanini, Nathani, Isis Zion, Profa. Luciana Pinato, Leila) pelo convívio e cada ajuda que porventura precisei. Isis, meu imenso obrigada pelas coletas de sangue.*

*Agradeço, especialmente, aos meus colegas, Ana Paula Quadros, Brian Ogushi, Juliana Botinhon pela colaboração direta e indireta; à Camila Lehnhardt, pelas conversas, compartilhamento de experiências e pela amizade; e, pelo acompanhamento desde o início, pelas discussões,*

*conversas e conhecimento compartilhado, pela disponibilidade, meu obrigada especial ao meu colega Juliano Froder.*

*À Larissa Zochio, técnica do laboratório CEPEN, por todas as dúvidas esclarecidas, pelas dicas, pelos auxílios, coletas de sangue, e pelos momentos de distração: nossos cafés, conversas e risadas. Acima de tudo, obrigada por sua amizade e por sempre me escutar.*

*À Dona Neide, pela hospedagem e todos os almoços e mimos durante minha estadia em Marília. Sua ajuda e carinho foram fundamentais para que eu pudesse estar tranquila e dedicasse o máximo do meu tempo às atividades do laboratório.*

*À profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, cujas conversas e incentivo foram fundamentais em minha decisão de cursar o mestrado. Obrigada por sua amizade, pela confiança, pelo incentivo, por me escutar ao longo de todo o processo e por ser essa pessoa tão especial. Você tem minha eterna gratidão e amizade.*

*A minha grande amiga, Jéssica Cristina dos Santos, e sua família. Qualquer palavra que eu usasse seria pouco para mostrar meu agradecimento diante de tudo o que fizeram por mim neste período. Deus coloca anjos em nossas vidas para nos ajudar, e vocês representaram isso para mim. Fica meu eterno agradecimento pelo carinho e amizade.*

*Ao prof. Dr. Renato Pirani Ghilardi da Faculdade de Ciências, UNESP, Campus de Bauru, pela atenção e pela gentileza em disponibilizar o laboratório didático de microscopia dessa universidade, para que eu pudesse concluir as análises das lâminas. Às funcionárias do Departamento de Ciências Biológicas, Cidinha e Letícia; e aos técnicos: Neide, Fátima e Marono, pela disponibilidade, simpatia e gentileza durante o período em que permaneci no laboratório.*

*À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa que me proporcionou cursar o mestrado sem muitas dificuldades, e a dedicação exclusiva ao meu projeto e às exigências do programa.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte ao desenvolvimento desta pesquisa (Processo nº 2014/26882-2).*

*Aos doadores voluntários de sangue periférico, pelo aceite e disponibilidade em participar deste projeto.*

*Ao Davi Müller pela paciência, atenção e cuidado em responder as inúmeras dúvidas e solicitações enviadas ao e-mail da pós-graduação.*

*Aos meus amigos que sempre estiveram presentes, e nunca deixaram de compreender os momentos em que não foi possível encontrá-los.*

*E, por fim, a esta universidade, seu corpo docente e administrativo, os quais possibilitaram o alcance deste título e a oportunidade de um futuro promissor.*



*“Mas, é preciso escolher. Porque o tempo foge. Não há tempo para tudo. Não poderei escutar todas as músicas que desejo, não poderei ler todos os livros que desejo, não poderei abraçar todas as pessoas que desejo. É necessário aprender a arte de ‘abrir mão’, a fim de nos dedicarmos àquilo que é essencial”.*

*(Rubem Alves)*

## RESUMO

Os monoterpenos são compostos terpênicos não-nutritivos, conhecidos por possuírem atividade protetora contra doenças. São produzidos pelas plantas como metabólitos secundários, sendo os compostos de maior frequência nos óleos essenciais. Presente no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, o geraniol – monoterpeneo alcoólico acíclico – é uma das moléculas mais comumente utilizadas pelas indústrias de sabor e fragrância. Além disso, inúmeras pesquisas o apontam como um composto promissor contra o câncer, o que torna imprescindível avaliar os riscos genéticos de seu uso frequente pela população. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico humano (células não-metabolizadoras) e em células de hepatocarcinoma humano HepG2 (células metabolizadoras), através, respectivamente, do teste do MTT, do ensaio cometa, e do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Para as células mononucleares, 4 concentrações (100, 50, 25 e 10 µg/mL) obtiveram viabilidade  $\geq 80\%$  nos ensaios de citotoxicidade, enquanto que para HepG2 foram 3 concentrações (5, 2,5 e 1,25 µg/mL), as quais foram empregadas nos testes. Para verificação de quebras em cadeia simples e duplas do DNA, foi realizado o ensaio do cometa alcalino, expondo os dois tipos celulares aos tratamentos com as concentrações de geraniol por um período de 4 horas, em triplicata, e 100 cometas por lâmina/concentração foram contados visualmente, classificando-os em: dano 0, 1, 2 ou 3, de acordo com a extensão da cauda. Já para o teste do MN, os linfócitos foram tratados por 28 horas – em duplicata –, enquanto que 24 horas de tratamentos foram empregadas para as células HepG2 – em triplicata. 1000 células binucleadas foram analisadas por lâmina/concentração, verificando a presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Os resultados obtidos apontaram que o geraniol, sem e após sua metabolização por enzimas hepáticas, não apresentou efeito genotóxico nas concentrações estudadas para ambos os tipos celulares. No entanto, foi constatada uma significativa redução, de maneira dose-dependente, na viabilidade de células HepG2 após exposição ao geraniol, reforçando os dados já existentes na literatura quanto à sua potente ação contra células tumorais.

**Palavras-chave:** Monoterpeneo. Geraniol. MTT. Ensaio do Cometa. Teste do Micronúcleo.

## ABSTRACT

Monoterpenes are non-nutritive terpenic compounds, known for their protective action against diseases. Produced by plants as secondary metabolites, they are the most common compounds in essential oils. Present in the essential oil of many aromatic plants, the geraniol – acyclic monoterpene alcoholic – is one of the most frequently used molecules by the flavour and fragrance industries. Furthermore, several research has shown it to be a promising compound against cancer, which makes it crucial to assess the genetic risks of its frequent use by the population. In light of this, this study aimed at evaluating the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of the geraniol in peripheral blood mononuclear cells (non-metabolising cells) and in human hepatoma cell line HepG2 (metabolising cells), by means of the MTT test, the comet assay, the cytokinesis-block micronucleus assay, respectively. For mononuclear cells, 4 concentrations (100, 50, 25, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) resulted in viability  $\geq 80\%$  in the cytotoxicity assay, while 3 concentrations for HepG2 (5, 2,5, 1,25  $\mu\text{g/mL}$ ) showed the same results, all of them being applied to the assays. To verify the single and double strand breaks, the alkaline comet assay was carried out, exposing both cell types to the treatment with geraniol concentrations for a period of 4 hours, in triplicate, and 100 comets per slide/concentrations were visually counted, being labelled as: damage 0, 1, 2, 3, according to the tail extent. Regarding the micronucleus test, the lymphocytes were treated for 28 hours – in duplicate – while 24 hours of treatment were applied to the HepG2 cells – in triplicate. 1000 binucleated cells were counted per slides/concentrations, verifying the presence of micronucleus, nucleoplasmic bridges and nuclear buds. The results obtained showed that geraniol, without and after being metabolised by liver enzymes, did not present genotoxic effect in the concentrations studied for both cell types. However, it was verified a significant dose-dependent reduction in the viability of HepG2 cells after exposure to geraniol, corroborating the data found in literature as to its potent action against tumoral cells.

**Key words:** Monoterpene. Geraniol. MTT. Comet assay. Micronucleus test.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Fórmula estrutural do isopreno .....   | 14 |
| Figura 2 – Estrutura química do geraniol.....   | 15 |
| Figura 3 – Células HepG2.....   | 21 |
| Figura 4 – Divisão do cometa em “cabeça” e “cauda” .....  | 23 |
| Figura 5 – Destinos possíveis de uma célula após contato com agente citotóxico e/ou mutagênico .....                      | 25 |
| Figura 6 – Obtenção de CBMN após centrifugação com histopaque® .....  | 30 |
| Figura 7 – Classes de danos em células mononucleares do sangue periférico humano avaliadas pelo Ensaio Cometa .....       | 34 |
| Figura 8 – Classes de danos em células de hepatocarcinoma humano HepG2 avaliadas pelo Ensaio do Cometa.....               | 34 |
| Figura 9 – Alterações encontradas em linfócitos binucleados do sangue periférico humano...36                              |    |
| Figura 10 – Alterações encontradas em células de hepatocarcinoma humano HepG2.....  | 37 |
| Figura 11 – Classificação de linfócitos do sangue periférico humano na determinação do Índice de Divisão Nuclear.....     | 37 |
| Figura 12 – Classificação de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) na determinação do Índice de Divisão Nuclear ..... | 37 |
| Figura 13 – Percentual de CBMN viáveis após exposição ao geraniol (MTT) .....   | 40 |
| Figura 14 – Percentual de células HepG2 viáveis após exposição ao geraniol (MTT).....                                     | 40 |

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%** – por cento

**μL** – microlitro

**mL** – mililitro

**μm** – micrômetro

**g/mL** – grama por mililitro

**μg/mL** – micrograma por mililitro

**mg/mL** – miligrama por mililitro

**NaHCO<sub>3</sub>** – bicarbonato de sódio

**CO<sub>2</sub>** – dióxido de carbono

**°C** – graus Celsius

**rpm** – rotação por minuto

**≥** – maior ou igual

**v/v** – volume por volume

**nm** – nanômetro

**μM** – micromolar

**pH** – potencial hidrogeniônico

**V** – volts

**M** – molar

**cm<sup>2</sup>** – centímetro quadrado

**T** – tempo

**<** – menor

**±** – mais ou menos

**mg/kg** – miligrama por quilograma

**mg/g** – miligrama por grama

**g/kg** – grama por quilograma

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 1.1      | GERANIOL.....  | 15 |
| 1.2      | GENÉTICA TOXICOLÓGICA E MUTAÇÃO .....  | 18 |
| 1.3      | CULTIVO CELULAR, CÉLULAS HepG2 E DO SANGUE HUMANO.....   | 19 |
| 1.4      | ENSAIO DO COMETA.....  | 21 |
| 1.5      | TESTE DO MICRONÚCLEO.....  | 23 |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | 26 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 27 |
| 3.1      | GERAL.....   | 27 |
| 3.2      | ESPECÍFICOS .....  | 27 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 28 |
| 4.1      | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....  | 28 |
| 4.2      | OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO GERANIOL.....   | 28 |
| 4.3      | TIPOS CELULARES.....   | 29 |
| 4.4      | OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO<br>PARA O TESTE DE CITOTOXICIDADE E PARA O ENSAIO DO COMETA ..... | 29 |
| 4.5      | CULTURA CELULAR.....   | 30 |
| 4.6      | ESCOLHA DOS CONTROLES PARA OS TESTES DE GENOTOXICIDADE .....   | 31 |
| 4.7      | AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO GERANIOL.....   | 31 |
| 4.8      | ENSAIO COMETA .....  | 33 |
| 4.9      | TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN) .....   | 35 |
| 4.10     | FORMAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....  | 37 |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | 38 |
| 5.1      | TESTE DO MTT.....  | 38 |
| 5.2      | AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DO GERANIOL (ENSAIO COMETA)...   | 41 |
| 5.3      | AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DO GERANIOL (TESTE DO MN) .....  | 42 |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 44 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 48 |
|          | <b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre-esclarecido (TCLE)</b> .....  | 55 |
|          | <b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....  | 57 |

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma variedade de compostos químicos, que podem ser divididos em duas categorias com funções distintas: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários – proteínas, gorduras, carboidratos, incluindo fibras dietéticas – são aqueles considerados essenciais à vida, pois contribuem para o metabolismo energético e para a estrutura da célula vegetal, sendo comuns a todas as plantas. Já os metabólitos secundários, ainda que não necessariamente essenciais ao organismo do produtor – não são nutritivos –, exercem importante papel na adaptação e interação da planta com seu ambiente, garantindo vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie: atua na defesa contra herbívoros e microrganismos; na proteção contra os raios UV ou outro estresse físico; como sinalizadores para atrair animais polinizadores e dispersores de sementes; como reguladores de crescimento, pigmentos e sabores. Além disso, representam uma importante fonte de fármacos ativos (WINK, 1999; BOURGAUD et al., 2001; SANTOS, 2001; BAKKALI et al., 2008; HUSSAIN et al., 2012; LEITZMANN, 2016).

Por séculos, metabólitos secundários vegetais têm sido usados na medicina tradicional, devido a sua grande atividade biológica e aos seus potenciais efeitos farmacológicos em humanos, o que os torna foco de estudo na área da saúde. Já foi demonstrado que 25% das moléculas utilizadas em países ocidentais são de origem vegetal. Inclusive, muitos dos medicamentos comercializados atualmente são derivados de modificações sintéticas simples ou cópias de substância obtidas naturalmente (BOURGAUD et al., 2001; LEITZMANN, 2016). Economicamente, os metabólitos secundários são importantes na produção de medicamentos, corantes e pigmentos, pesticidas, sabor e fragrâncias, e como aditivos alimentares (HUSSAIN et al., 2012).

Com ampla distribuição na natureza e abundantemente presente em plantas superiores, os terpenoides – também conhecidos como isoprenoides ou terpenos – são a maior classe de metabólitos vegetais secundários. Possuem estrutura química variável entre si, exibindo centenas de esqueletos de carbonos diferentes, e uma grande diversidade de grupos funcionais. São sintetizados através da conversão do mevalonato em um isopreno ativo (isopentenil-pirofosfato ou pirofosfato de isopentenila), a unidade básica formadora deste grupo. Em geral, durante a formação dos terpenoides, unidades de isopreno (Figura 1) se ligam entre suas extremidades superior e inferior (condensação cabeça-cauda), e o número de unidades presentes nessa estrutura serve de base para sua classificação. Sendo assim, incluídos em suas maiores categorias, estão: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos

(C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>) constituídos, respectivamente, por duas, três, quatro, seis e oito unidades de isopreno. Para os monoterpenos, mais de 25.000 compostos isolados já foram reportados. (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; GERSHENZON; KREIS, 1999; SANTOS, 2001; HUSSAIN et al., 2012).

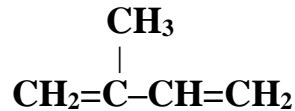


Figura 1 - Fórmula estrutural do isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>).

Os monoterpenos são os compostos terpênicos de maior frequência nos óleos voláteis (representando 90% de seu total), juntamente com os sesquiterpenos. Conforme definição da *International Standard Organization* (ISO), óleos voláteis são produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água ou pela compressão dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas, de aparência oleosa em temperatura ambiente, geralmente de aroma agradável e intenso, características que permitem serem denominados também de óleos essenciais ou essências (SIMÕES; SPITZER, 2001).

Numerosos compostos orgânicos (aproximadamente de 20 a 60), como hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, óxidos, ésteres, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, são encontrados nos óleos essenciais (OEs) em diferentes concentrações. Poucos OEs apresentam um único componente em alta porcentagem. Normalmente, há um composto majoritário, seguido por outros de menor teor, além de alguns denominados “traços”, cuja quantidade é baixíssima, mas, muitas vezes, indispensável para a composição de seu odor e aroma (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES; SPITZER, 2001; BAKKALI et al., 2008). Francisco de Barros e colaboradores (2009), por exemplo, identificaram, nas quatro estações do ano de 2005, um total de 42 constituintes no óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), cujos componentes majoritários foram o linalol (50,0-79,2%) e o 1,8-cineol (7,3-14,1%). Normalmente, são os constituintes majoritários de um óleo essencial que determinam suas propriedades biológicas (BAKKALI et al., 2008).

Atividades terapêuticas têm sido relatadas para os óleos essenciais de várias espécies vegetais devido à presença de monoterpenos em sua composição (CROWELL, 1999; BAKKALI et al., 2008; BHALLA; GUPTA; JAITAK, 2013; SOBRAL et al., 2014). Esses compostos são conhecidos, junto a outros fitoquímicos, por possuírem atividade protetora



contra doenças. Sendo assim, seus efeitos farmacológicos são de grande interesse e estão sendo explorados extensivamente (TWIARI; KAKKAR, 2009). Ademais, são usados em cosméticos e preparações farmacêuticas, bem como na indústria alimentícia (SOBRAL et al., 2014). Nesse cenário, o geraniol – importante constituinte do óleo essencial de muitas plantas aromáticas – surge como um monoterpeno quimiopreventivo promissor, além de um possível agente natural no combate a doenças cardiovasculares (CROWELL, 1999; BAKKALI et al., 2008; CRESPO et al., 2012; BAYALA et al., 2014), sendo uma das moléculas mais comumente utilizadas pelas indústrias de sabor e fragrância (CRESPO et al., 2012).

### 1.1 GERANIOL

O geraniol (3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol) é um monoterpeno alcoólico acíclico (Figura 2), isolado principalmente do óleo de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) (53,5-65%), mas comumente encontrado também em outros óleos essenciais, como, por exemplo, nos óleos de bergamota selvagem (*Monarda fistulosa*), de rosas e de citronela. Sua coloração é amarelo-claro e seu odor, semelhante a rosas. Possui consistência oleosa, sendo, portanto, insolúvel em água, mas solúvel em grande parte dos solventes orgânicos. É formado por dois isômeros: geraniol (*trans*) e nerol (*cis*), e possui a fórmula química:  $C_{10}H_{18}O$ . Trata-se de um importante componente dos óleos essenciais de frutas cítricas, como o limão, lima e laranja; do gengibre; de sementes, como a noz-moscada; e de plantas medicinais (PRASHAR et al., 2003; TWIARI; KAKKAR, 2009; CHEN; VILJOEN, 2010; VIEIRA et al., 2011; MANDANKUMAR et al., 2013; SHARMA; KHAN; MANZOOR, 2016). Burdock (2010) relata sua presença em mais de 160 óleos essenciais.

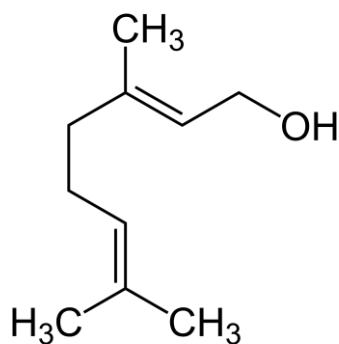


Figura 2 – Estrutura química do Geraniol

Devido ao seu aroma, é de grande interesse para as indústrias química, de perfumes e de alimentos (VIEIRA et al., 2011), já que é empregado como fragrância em produtos de higiene pessoal, como xampus e sabonetes; e em produtos de limpeza, como detergentes (LAPCZYNSKI et al., 2008). Possui ação anti-helmíntica (contra parasitas de peixe) (BARROS, L. et al., 2009), antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, repelente e inseticida: foi mais eficaz no combate a ácaros que o produto tradicionalmente comercializado, mantendo resultado superior mesmo quando comparado a outros monoterpenos (CHEN; VILJOEN, 2010). Carvalho et al. (2014) demonstraram que o geraniol possui significativo efeito protetor contra danos induzidos no duodeno e na mucosa gástrica por diferentes agentes ulcerogênicos.

Pesquisas realizadas com produtos cosméticos de companhias bem conhecidas na Europa e nos Estados Unidos revelaram a presença do geraniol em 76% dos desodorantes investigados, e em 33% dos produtos cosméticos (shampoos, géis, cremes, loções e óleo de massagem), em geral, avaliados (RASTOGI et al., 1996, 1998). Em 2001, 59 produtos de limpeza domésticos e profissionais, adquiridos em pontos de venda de 4 países, foram avaliados e esse monoterpeno estava presente em 41% deles (RASTOGI et al., 2001). O Conselho Europeu incluiu o geraniol na lista de substâncias que podem ser usadas em gêneros alimentícios (LAPCZYNSKI et al., 2008), sendo permitida, segundo Sinha e colaboradores (2014), dose diária de 0,5 mg/kg de peso corporal/dia. Diversas instituições, incluindo a *Food and Drug Administration*, reconheceram o geraniol como um produto seguro, não apresentando riscos ao empregá-lo como aromatizante. E o Conselho Europeu o incluiu na lista de substâncias cujo uso é permitido em gêneros alimentícios (LAPCZYNSKI et al., 2008). Estima-se que sua utilização anual ultrapassa 1000 toneladas (LAPCZYNSKI et al., 2008; CHEN; VILJOEN, 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* apontaram efeito citostático e/ou citotóxico do geraniol sobre diversas linhagens tumorais, incluindo células de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2, hepatocarcinoma em rato, neoplasia mamária e pancreática em rato e hamster, leucemia murina, melanoma, atuando até mesmo em lesões pré-neoplásicas (CARNESECCHI et al., 2001; USTA et al., 2009; CHEN; VILJOEN, 2010; VIEIRA et al., 2011). Especificamente para o câncer de próstata (PC-3), Lee e colaboradores (2016) constataram que o geraniol diminuiu os níveis de expressão do fator de transcrição E2F8, importante influenciador no prognóstico de pacientes com esse tipo de câncer, já que o aumento da sua expressão está relacionado à ocorrência de metástase. E2F8 exerce papel crucial no controle da progressão

do ciclo celular para as fases G2 e M, portanto, a redução de sua expressão suprime o crescimento de células PC-3 (LEE et al., 2016).

Madankumar et al. (2013) constataram que o geraniol dissolvido em óleo de milho, administrado 3 vezes por semana (200 mg/kg), em ratos portadores de carcinoma oral, é capaz de diminuir o número e o volume de células tumorais, reduzindo a atividade de enzimas de fase I, responsáveis por ativar metabolicamente o carcinógeno. Simultaneamente, a ação do geraniol promoveu um aumento na expressão de enzimas de detoxificação de fase II (MADANKUMAR et al., 2013). Ou seja, além de geraniol ter promovido uma menor ativação do carcinógeno, também aumentou os processos metabólicos relacionados a sua excreção.

Em 2002, Carnesecchi e colaboradores (2002), tendo em vista a alta resistência do câncer de cólon à quimioterapia, investigaram a possibilidade de o geraniol sensibilizar a linhagem celular Caco-2, de carcinoma colorretal humano, para o tratamento com 5-FU, um quimioterápico usado na terapia colorretal. Os resultados mostraram que o geraniol induziu modificações na membrana celular, o que inibiu o processo de diferenciação celular (intimamente relacionado à alta resistência do câncer à quimioterapia), e melhorou a captação de 5-FU pelas células, aumentando os efeitos citotóxicos promovidos pelo quimioterápico, sendo necessária uma quantidade menor de droga em comparação àquela empregada quando administrada individualmente.

A ação terapêutica de geraniol não se restringe apenas ao câncer. Em estudo de Rekha et al. (2013), o geraniol atuou eficazmente na redução dos sintomas característicos da doença de Parkinson, em modelo de camundongos induzidos com MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina) – neurotoxina que produz sintomas desta doença. Camundongos previamente tratados com geraniol diluído em etanol absoluto (100 mg/kg) – 1h antes da injeção de MPTP –, durante 7 dias, mostraram melhora significativa na coordenação motora, com o restabelecimento da geração, expressão e atividade de fatores neurotróficos, e inibição do estresse oxidativo, aumentando o número de neurônios imunorreativos dopaminérgicos, o que favoreceu a síntese de dopamina, neurotransmissor cuja produção é diminuída ou ausente em pessoas com doença de Parkinson.

Diante do exposto, o vasto uso e a possibilidade de emprego do geraniol nas mais diversas terapias, torna-o um importante alvo de estudo na área da genética toxicológica, sendo extremamente relevante a avaliação de seu potencial citotóxico e genotóxico sobre células humanas em cultura, a fim de atestar a segurança de seu uso em humanos.

## 1.2 GENÉTICA TOXICOLÓGICA E MUTAÇÃO

A genética toxicológica é uma das áreas da ciência responsável por detectar substâncias capazes de induzir mutação e por avaliar o risco mutacional para o homem, a fim de estabelecer níveis aceitáveis de exposição e adotar medidas preventivas para a redução de certos tipos de cânceres e para a conservação do nosso DNA. Todo agente mutagênico, isto é, capaz de induzir mutações, pode ser um potencial cancerígeno, já que o acúmulo de lesões no DNA pode colaborar para o desenvolvimento de cânceres (RABELLO-GAY, 1991; TAKAHASHI, 2003).

Qualquer alteração permanente na sequência de uma molécula de DNA é denominada mutação. O DNA de um organismo está frequentemente exposto a alterações ou danos provocados por uma diversidade de agentes físicos, químicos e/ou biológicos presentes no cotidiano, além de o próprio ambiente celular ser capaz de danificá-lo (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTALEONE-NETO, 1991; ZAHA, 1996), por exemplo, por meio de processos metabólicos que produzem radicais livres de oxigênio e nitrogênio, altamente reativos, capazes de alterar suas bases.

As mutações podem surgir em células somáticas e germinativas, neste último caso de caráter hereditário, podendo ser transmitidas às próximas gerações. Quando ocorrem sem a participação de um agente mutagênico, surgindo em todas as células, são denominadas espontâneas. Já quando há participação de um agente mutagênico, são consideradas mutações induzidas. Além disso, podem provocar danos no material genético na forma de aberrações cromossômicas, subdivididas em: estruturais (translocações, inversões, deleções, duplicações) ou numéricas (aneuploidias), ambas intimamente relacionadas às neoplasias, o que torna relevante a realização de ensaios capazes de identificar substâncias clastogênicas (capazes de quebrar cromossomos) e aneugênicas (que interferem no processo de formação do fuso mitótico, alterando a correta distribuição dos cromossomos) (TAKAHASHI, 2003; GRIFFITHS; WESSLER; LEWONTIN, 2011; MALACINSKI, 2011).

A ação de mutágenos sobre o DNA pode vir a se manifestar somente após muitos anos, como resultado de seus efeitos cumulativos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Substâncias químicas reativas presentes em um organismo em concentrações subtóxicas – ou seja, incapaz de desencadear morte celular – podem interagir diretamente com a molécula de DNA, resultando em diversos tipos de danos, inclusive lesões pró-mutagênicas, sejam elas provocadas pelo próprio composto ou por falhas no sistema de reparo do DNA, podendo levar à transformação celular (EISENBRAND et al., 2002). Por isso, é importante investigar a

biossegurança de quaisquer substâncias de uso ou exposição frequente pela população, especialmente se a ela é atribuído algum efeito terapêutico.

### 1.3 CULTIVO CELULAR, CÉLULAS HepG2 E DO SANGUE HUMANO

Iniciado no século XX, e uma das principais ferramentas empregadas em biologia celular e molecular, o cultivo celular é um excelente modelo para o estudo de mutagênese e carcinogênese, além de funcionar como um método preditivo dos efeitos de drogas e compostos tóxicos sobre os seres humanos. Também é utilizado na triagem de drogas e no desenvolvimento e fabricação em grande escala de compostos biológicos, como vacinas e proteínas terapêuticas (EISENBRAND et al., 2002; ALVES; GUIMARÃES, 2010; GIBCO, 2015).

O ambiente de cultivo *in vitro* difere-se daquele encontrado *in vivo*. Em geral, as células deixam de possuir uma geometria tridimensional, a adesão célula-célula e célula-matriz é comprometida, e perde-se componentes envolvidos na regulação homeostática *in vivo*, tornando o metabolismo *in vitro* mais constante, não representando com fidelidade o tecido de origem, embora sejam incluídos diferentes hormônios e fatores de crescimento aos meios de cultura (ALVES; GUIMARÃES, 2010; FRESHNEY, 2016). Ainda assim, o cultivo celular é o principal modelo em substituição ao uso de animais em experimentação (ALVES; GUIMARÃES, 2010), e os resultados obtidos *in vitro* são de fundamental importância para os experimentos *in vivo*, pois possibilita fornecer dados quanto ao grau de toxicidade da substância-teste e entender seus mecanismos de ação, apontar se a droga lesa o DNA direta ou indiretamente, se as células são capazes de absorvê-la, e a concentração ideal para experimentação (EISENBRAND et al., 2002; TAKAHASHI, 2003).

Células de mamíferos podem ser cultivadas através da formação de uma monocamada celular aderida a um substrato sólido, ou suspensas em um meio de cultura (SCHINDLER, 1969; FRESHNEY, 2016). As culturas em suspensão são constituídas de células com capacidade para sobreviverem e se proliferarem sem necessidade de fixação, como, por exemplo, as células hematopoiéticas. Por outro lado, no cultivo em monocamada é necessária a fixação celular para que ocorra sua proliferação, sendo este, junto às células hematopoiéticas, o modelo de cultivo comum à maioria das células. Tendo alcançada uma taxa de crescimento significativa – confluência –, e passado por um tratamento enzimático (para células aderentes), ou sofrido uma diluição (para células em suspensão), um subcultivo pode ser realizado (FRESHNEY, 2016).

Há 3 tipos de cultivo celular: primário, linhagem celular contínua e linhagem celular transformada. Em um cultivo primário, as células que sobreviveram à desagregação mecânica ou enzimática (com tripsina, por exemplo), conseguindo se proliferar satisfatoriamente em cultura, mantêm as características do tecido de origem e uma vida útil relativamente curta, como ocorre geralmente com as células do sangue periférico humano. Contudo, as células mais resistentes ao processo de cultivo e com uma alta taxa proliferativa conseguem sobreviver a subseqüentes passagens, dando origem a uma linhagem celular contínua, capaz de ser mantida em cultura por um longo período, e sem perder a maioria das características de seu tecido de origem – como a MRC-5, de tecido pulmonar de feto humano, por exemplo. Por outro lado, uma linhagem celular transformada, é formada por células que sofreram alterações genéticas – como as células VERO e HeLa –, perdendo a semelhança morfológica e genética com seu tecido de origem, e com capacidade de se proliferar indefinidamente. A transformação celular pode ocorrer em cultura, empregando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos, capazes de alterar proto-oncogenes e genes supressores tumorais, que controlam o ciclo celular. Outra forma de obtenção de células transformadas se dá por tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Exemplo de linhagem aderente transformada, as células HepG2 são derivadas de hepatocarcinoma humano. Possui morfologia semelhante ao epitélio, com células formadas por apenas 1 núcleo e aneuploides: o número de cromossomos varia de 48 a 54 por célula (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; WILKENING; STAHL; BADER, 2003) (Figura 3). São fáceis de manusear, e expressam uma grande variedade de funções metabólicas do fígado (JAVITT, 1990; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Apresentam diferentes enzimas de fase I e de fase II envolvidas na ativação e detoxificação de drogas e outros compostos, sendo, portanto, muito úteis em estudos de genotoxicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos e a maioria dos compostos genotóxicos são mutágenos indiretos: apenas após sua biotransformação liberam intermediários reativos capazes de desempenhar efeitos tóxicos (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; MENDES, 2008). Resultados obtidos por Natarajan e Darroudi (1991) confirmaram a competência metabólica de células HepG2 em transformar diversas classes de pró-carcinógenos em produtos biologicamente ativos. Sendo assim, a HepG2 foi considerada a mais promissora das linhagens celulares permanentes (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003), mimetizando satisfatoriamente os processos de ativação e detoxificação ocorridos *in vivo* (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; YUSUF, 2000), embora Wilkening, Stahl e Bader (2003) tenham descrito que HepG2 possui grande semelhança com o fígado fetal, devido à

expressão de enzimas (CYP3A7, e CYP1A1 mais fortemente que CYP1A2) características deste.

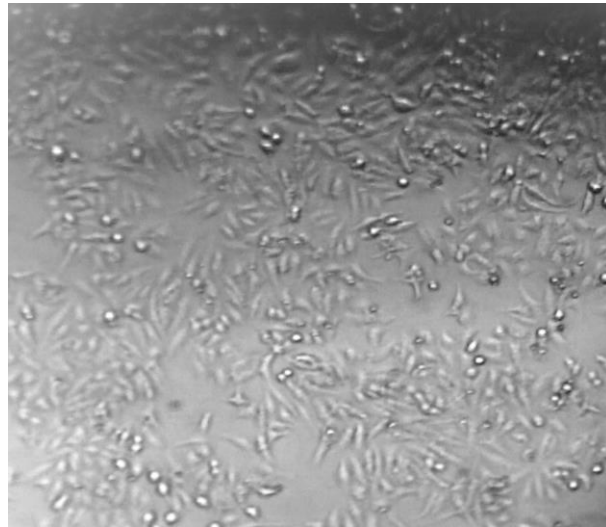


Figura 3 – Células HepG2 em cultivo em plena expansão. Aumento final: 200x.  
Fonte: Arquivo pessoal.

Diferentemente, as células mononucleares do sangue periférico humano (linfócitos e monócitos) não possuem enzimas de biotransformação, portanto, não ativam agentes mutagênicos indiretos, mas informam sobre a ação de mutágenos diretos, ou seja, que possuem efeitos genotóxicos por si só, sem necessidade de metabolização. Além disso, a facilidade em sua obtenção, simplicidade de seu cultivo e sensibilidade do teste, torna o sangue periférico o tecido mais utilizado para diagnóstico citogenético (GUS, 2011).

Para demonstrar o potencial mutagênico do agente testado é necessário mais de um ensaio biológico para confirmação dos resultados, sobretudo se isso for afetar o homem diretamente (TAKAHASHI, 2003). Dentre os testes de genotoxicidade de curto prazo, o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa são os mais promissores para a avaliação de risco humano, em razão de sua sensibilidade e facilidade na realização (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

#### 1.4 ENSAIO DO COMETA

Empregado para detectar lesões genômicas, e não mutações, o ensaio do cometa (*Single-Cell Gel Electrophoresis– SCGE*) foi primeiramente introduzido por Östling e Johanson, em 1987, como uma técnica de microeletroforese para visualizar danos ao DNA em

células individuais. As lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção, uma vez que lesões genômicas só resultam em mutações – irreversíveis – após serem processadas (AHUJA & SARAN, 2001; GONTIJO; TICE, 2003).

Há dois protocolos principais para realização do teste, diferenciados pelo pH: a versão neutra, que identifica quebras duplas nas moléculas de DNA e *crosslinks*; e a versão alcalina, que detecta quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis - alterações induzidas em maior escala por agentes genotóxicos -, e *crosslinks*. A técnica consiste em expor uma suspensão de células, embebidas em gel de agarose, sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são depositadas em uma solução de lise, composta por alta concentração de sais e detergentes, para que ocorra a remoção do conteúdo citoplasmático e da membrana nuclear das células, levando a uma expansão do DNA no gel, no espaço antes ocupado pela célula. Logo após, as lâminas são imersas em tampão (alcalino ou neutro), para que ocorra o rompimento das estruturas secundária e terciária do núcleo celular, promovendo o desenovelamento das cadeias de DNA. Ao final desse processo de desnaturação, inicia-se a corrida eletroforética em baixa voltagem. Como o DNA possui carga, caso esteja rompido, ocorre a expansão de seus fragmentos em relação ao núcleo principal (nucleoide), no sentido da corrente elétrica, determinando, assim, a extensão do dano ao DNA. Nucleoides com DNA intacto são redondos, pois permanecem empacotados, sendo muito grandes para migrar; enquanto que em células lesadas há a migração de DNA para fora do núcleo, gerando uma figura semelhante a um cometa. O resultado é interpretado dividindo-o em duas partes: “cabeça” e “cauda” (Figura 4). Com isso, células sem cauda possuíam nenhum ou pouco dano no DNA; enquanto células com mais danos apresentariam cauda (FARBAIN; OLIVE; O’NEILL, 1995; TICE, 2000; AHUJA; SARAN, 2001; GONTIJO; TICE, 2003; VILLELA et al., 2003; MALUF; ERDTMANN, 2003).



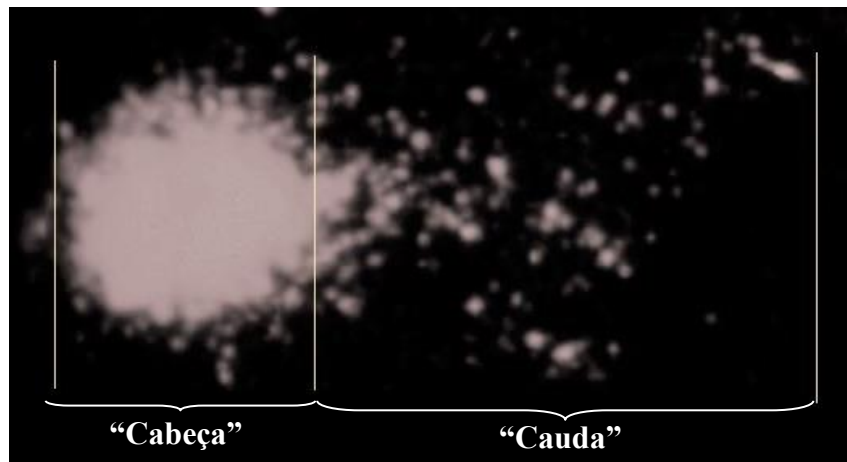


Figura 4 – Divisão do cometa em “cabeça” e “cauda”, para classificação dos danos no DNA, em célula mononuclear do sangue periférico humano. Aumento final: 400x.  
Fonte: Arquivo pessoal.

O Ensaio do Cometa é mais vantajoso em comparação a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, pois possui sensibilidade para a quantificação de baixos níveis de danos genéticos; facilidade de aplicação; exige um pequeno número de células por amostra, sem necessidade de estarem em proliferação; e pequenas quantidades da substância teste. É amplamente aplicado em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, incluindo estudos de biomonitoramento humano e ambiental. Além disso, possui baixos custos e é necessário um período curto de tempo para realização do experimento. Contudo, como o reparo do DNA lesado inicia-se imediatamente, o intervalo de tempo entre a exposição ao mutágeno e o preparo das lâminas até a lise, deve ser curto, no máximo 24 horas (TICE, 2000; VILLELA et al., 2003).

### 1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

O Teste do Micronúcleo é um método simples na avaliação de diversos tipos de danos citogenéticos, detectando mutações cromossômicas, do tipo clastogênica, aneugênica e danos no fuso mitótico (VILLELA et al., 2003). Foi desenvolvido por Matter e Schmid, em 1971, *in vivo*, em eritrócitos de medula óssea de camundongo. Posteriormente, em 1976, foi estabelecida por Heddle sua versão *in vitro*, utilizando linfócitos do sangue periférico humano. Essa versão evoluiu rapidamente no campo da Genética Toxicológica e, segundo Fenech (2000), foi proposto que o teste do micronúcleo fosse aplicado em substituição ao teste de aberração cromossômica em linfócitos humanos, para os ensaios de genotoxicidade

de novos produtos químicos, já que este último exige muito tempo nas análises e pessoal altamente treinado (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

Localizado no citoplasma, o micronúcleo (MN) é uma pequena massa nuclear de diâmetro entre 1/16 e 1/3, contendo DNA, delimitada por membrana e sem qualquer conexão com o núcleo principal. Sua formação ocorre durante a telófase (mitose ou meiose), quando o envoltório nuclear se reconstitui ao redor dos cromossomos das células-filhas. O MN é resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos (originados de quebra isocromatídica ou cromatídica) ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal; ou de disfunções no fuso mitótico; ou pela falta ou defeito no centrômero, impossibilitando a ligação com as fibras do fuso; ou de quaisquer mecanismos falhos que permitem a distribuição incorreta dos cromossomos após a anáfase. Sendo assim, podem ser causados por agentes clastogênicos (quebram cromossomos) ou aneugênicos. Apenas após um ciclo de divisão celular, os danos causados pela exposição a agentes mutagênicos são expressos na forma de MN, podendo haver mais de um MN por célula (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991; KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; PALAZZO; MALUF, 2011; DAVARI et al., 2012; LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013). As quebras de cadeias duplas são as principais responsáveis pela indução de micronúcleos por agentes clastogênicos (VAN GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

As células se dividem em taxas diferentes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo dependentes das condições fisiológicas, genéticas e nutricionais. Diante disso, para ser possível diferenciar as células que passaram por um ciclo de divisão celular (ou seja, ficaram binucleadas), foi necessário adicionar uma substância – Citocalasina B (CtB) – capaz de bloquear a citocinese celular durante o teste de MN *in vitro*. A CtB é um inibidor da polimerização da proteína actina necessária para a formação do anel de microfilamentos responsável por contrair o citoplasma e dividir a célula em duas células-filhas. Portanto, com o bloqueio da citocinese, ocorre o acúmulo de células binucleadas, facilitando essa diferenciação e análise. A partir disso, o teste do micronúcleo ficou conhecido como CBMN (*cytokinesis-block micronucleus*) – teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (FENECH, 2000; PALAZZO; MALUF, 2011).

Além da formação de micronúcleos, pode ocorrer, ocasionalmente, a formação de pontes nucleoplasmáticas (PNPs): ligações contínuas entre os núcleos da célula binucleada. PNPs são formadas, possivelmente, por cromossomos dicêntricos que tiveram seus centrômeros tracionados para pólos opostos da célula, durante a anáfase, sendo o DNA

(resultante na ponte) coberto por uma membrana nuclear. Podem ser marcadas juntamente com a contagem de MNs, devido fornecerem uma medida adicional e complementar de um rearranjo cromossômico (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; PALAZZO; MALUF, 2011).

Outra alteração possível de ocorrer é o broto ou “bud” nuclear. Trata-se de uma estrutura semelhante ao micronúcleo, mas que permanece ligado ao núcleo principal por uma conexão nucleoplasmática fina ou espessa. Acredita-se que essa estrutura seja DNA amplificado (eliminado do núcleo por um processo ativo), e que corresponda a uma resposta à resistência celular a drogas ou à progressão tumoral (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; PALAZZO; MALUF, 2011).

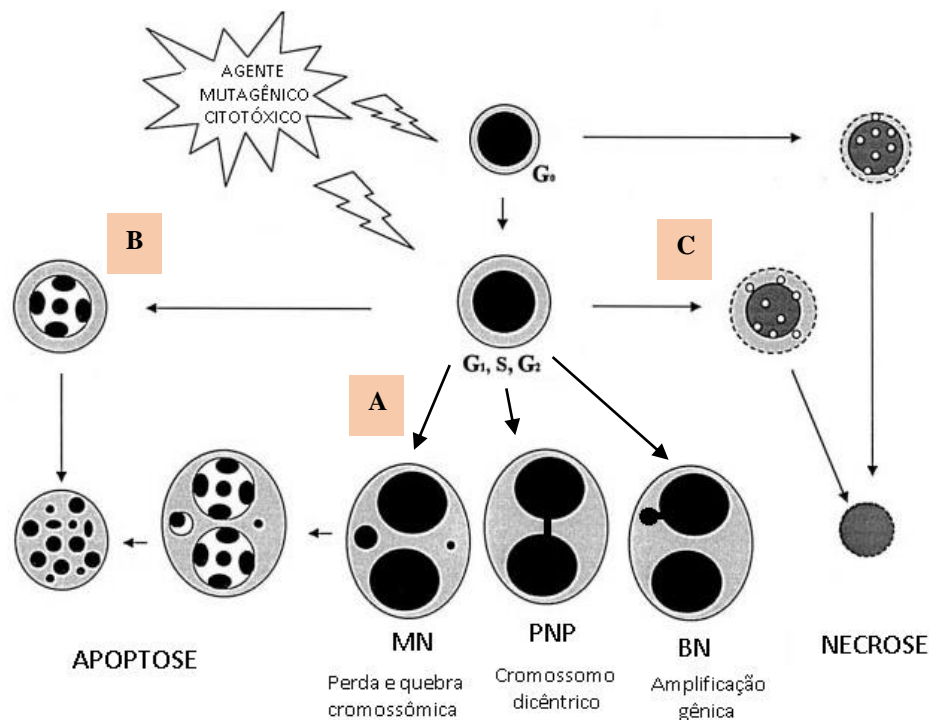


Figura 5 – Destinos possíveis de uma célula após contato com agente mutagênico e/ou citotóxico: A) Alterações genéticas, visíveis pelo teste do micronúcleo com o bloqueio da citocinese: MN – micronúcleo, caracterizado pela perda de um cromossomo inteiro ou fragmentos de cromossomos acêntricos; PNP – ponte nucleoplasmática, formada por cromossomo dicêntrico que teve seus centrômeros tracionados para pólos opostos da célula, sendo o DNA resultante na ponte coberto por membrana nuclear; BN – broto nuclear, constituído por DNA amplificado; B) Apoptose, desencadeada durante as fases G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub> do ciclo celular pela ação direta de um agente citotóxico, ou por acúmulo de alterações genéticas promovidas por um agente mutagênico, após conclusão do ciclo celular; C) Necrose, também desencadeada durante as fases G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub> do ciclo celular pela ação direta de um agente citotóxico.

Fonte: Modificado de Fenech (2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o grande potencial terapêutico do geraniol, especialmente como uma provável molécula para desenvolvimento de drogas contra o câncer, além de seu disseminado uso como ingrediente dos mais diversos produtos presentes em nosso cotidiano, é imprescindível a avaliação dos efeitos de sua exposição ou uso frequente pela população, sobre o DNA humano, principalmente devido à relação intrínseca entre mutação e câncer. Até o momento, estudos com esse monoterpene não lhe atribuíram potencial tóxico sobre o DNA (ISHIDATE et al., 1989; DOPPALAPUDI et al., 2007; SINHA et al., 2014), embora ainda faltem relatos utilizando células humanas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o potencial citotóxico e genotóxico do geraniol sobre células humanas, como parte de um estudo mais amplo de avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de constituintes de óleos essenciais (Projeto FAPESP, processo número 2014/26882-2).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar, *in vitro*, o possível potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do geraniol em células humanas.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- a) Investigar a citotoxicidade do geraniol em cultura de células mononucleares (monócitos e linfócitos) do sangue periférico humano e de células HepG2, pelo teste do MTT;
- b) Avaliar a genotoxicidade do geraniol em cultura de células mononucleares (monócitos e linfócitos) do sangue periférico humano e de células HepG2, pelo Ensaio do Cometa;
- c) Avaliar o potencial mutagênico do geraniol em cultura de linfócitos humanos do sangue periférico e de células HepG2, pelo Teste do Micronúcleo em Células Binucleadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP, campus de Marília e aprovado em 06 de agosto de 2014, sob o número de protocolo: 1009/2014 (ANEXO A), visto que coletamos amostra de sangue periférico de indivíduos adultos e saudáveis, de ambos os sexos, que aceitaram participar do projeto, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), elaborado de acordo com a Resolução 196/96, versão 2012. Os dados foram mantidos sob sigilo e a apresentação de resultados será apenas em meios de divulgação científica.

### 4.2 OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO GERANIOL

O geraniol (CAS 106-24-1, 98% de pureza) foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Co., LLC, St. Louis, MO, Estados Unidos.

Óleos essenciais possuem solubilidade limitada em água, apenas aromatizando as soluções aquosas (SIMÕES; SPITZER, 2001). Dessa forma, polissobartos, como Tween 80, são tradicionalmente empregados como agentes emulsificantes para emulsões óleo em água ou solução aquosa, pois possuem um alto equilíbrio hidrófilo-lipófilo, que permite a formação de uma película entre as fases aquosa e oleosa, estabilizando-as, e ocorrendo, por fim, a solubilização da amostra (ZANIN et al., 2002; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Assim sendo, para uso em cultura, o geraniol foi diluído em solução de Tween 80 a 8%, obtida a partir da mistura de 800 µL de Tween 80 (Dinâmica®, CAS [9005- 65- 6]) em 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®). A solução de Tween foi homogeneizada em aparelho agitador do tipo Vórtex (Labnet) e, em seguida, filtrada e esterilizada em filtro de membrana de 0,22 µm (Millex®, Merck), para uso na diluição do óleo. O geraniol foi, então, diluído na proporção de 1 g/mL dessa solução, durante 5 minutos, em agitador do tipo vórtex. Em seguida, por diluição seriada foram obtidas as concentrações de 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 175, 250, 500 e 1000 µg/mL empregadas nos testes para verificação de citotoxicidade.

#### 4.3 TIPOS CELULARES

Foram utilizados para os experimentos dois tipos celulares:

1) células mononucleares do sangue periférico humano (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) obtidas de 2 doadores (1 homem e 1 mulher) saudáveis, jovens (entre 18 e 35 anos), não-fumantes, sem histórico de doenças e sem exposição recente a agentes genotóxicos, tais como, produtos químicos e radiação ionizante, conforme OECD *Guidelines for the testing of Chemicals* TG 487 (2014);

2) células de hepatocarcinoma humano HepG2, metabolicamente competentes, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, situado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, e conservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Genética Toxicológica, localizado no CEPEN, UNESP, Campus II de Marília, SP.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO PARA O TESTE DE CITOTOXICIDADE E PARA O ENSAIO DO COMETA

Para obtenção de células mononucleares, foram coletados 9 mL de sangue periférico humano, em seringa heparinizada. Em seguida, 3 mL foram transferidos vagarosamente pela parede de três tubos contendo 3 mL de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) – meio de gradiente de densidade que permitirá a separação de linfócitos e monócitos. O material foi centrifugado a 1900 rpm durante 30 minutos, a fim de ocorrer a separação das células mononucleares dos demais componentes do sangue. Após a centrifugação, observou-se a formação de quatro camadas: a camada superior, contendo plasma e plaquetas, seguida de uma fina camada esbranquiçada de células mononucleares (“nuvem” ou halo); a terceira, formada pela Histopaque® e, por fim, a última camada contendo os glóbulos vermelhos e granulócitos, cuja densidade é maior que o meio de gradiente, ocorrendo seu acúmulo na parte inferior dos tubos (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2014) (Figura 6).



Figura 6 – Disposição das células do sangue no tubo de centrífuga, após centrifugação com Hitopaque® (meio de gradiente de densidade).

Modificado de Riedhammer, Halbritter e Weissert (2014).

A camada de PBMCs de cada tubo foi coletada cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e reservada, respectivamente, em outros três tubos contendo 3 mL de meio RPMI 1640. Durante 10 minutos a 1500 rpm, os tubos foram novamente centrifugados. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, deixando o pellet e aproximadamente 1 mL de meio. Juntou-se o conteúdo dos três tubos, seguido de homogeneização, e 20  $\mu$ L da suspensão celular foram reservados em microtubo. Destes, 10  $\mu$ L foram misturados a 10  $\mu$ L do corante azul de trypan, e depositados em câmara de Neubauer para contagem das células. O volume a ser pipetado foi determinado de acordo com a densidade celular desejada para cada teste, com base na seguinte regra de três:

$$\frac{\text{Média de células contadas} \times 10^4 - \text{Volume de suspensão celular no tubo}}{\text{Densidade celular desejada} - \text{Volume a ser pipetado em cada poço (X)}}$$

#### 4.5 CULTURA CELULAR

As células mononucleares do sangue periférico humano foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®), suplementado com 15-20% de soro fetal bovino (Gibco®), 1%



de antibiótico/antimicótico (Gibco®) e, apenas para o teste do micronúcleo, para estimular a divisão dos linfócitos, foram adicionados 5 µg/mL de fitohemaglutinina.

As células HepG2 foram cultivadas como uma monocamada, em meio MEM (Meio Mínimo Essencial, Gibco®) acrescido de 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e 1% de piruvato de sódio (Gibco®), suplementado com 15-20% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco®). Antes de cada teste, as HepG2 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> por pelo menos 5 dias, tempo necessário para o alcance de confluência  $\geq$  80% e obtenção de concentração de células suficiente para a realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

Todos os cultivos foram realizados em estufa umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

#### 4.6 ESCOLHA DOS CONTROLES PARA OS TESTES DE GENOTOXICIDADE

A fim de viabilizar os experimentos, foram preparados controles positivos e negativo.

O controle negativo de todos os testes foi o veículo utilizado para diluição do geraniol: a solução de Tween 80 a 8%.

Os controles positivos para o Teste do Micronúcleo e o Ensaio Cometa foram estabelecidos conforme OECD TG 487 e 489 (2014), respectivamente. A OECD 487 (2014) relaciona diversos controles positivos, separando-os conforme necessidade de ativação metabólica. Sendo assim, para CBMN em HepG2, uma das indicações é o uso da droga clastogênica benzo(a)pireno (BaP), que requer sua biotransformação por enzimas hepáticas, a fim de desempenhar efeito mutagênico, tendo em vista que sua ativação em humanos ocorre principalmente por CYP1A1 (citocromo P450) (WILKENING, STAHL, BADER, 2003). Já para células mononucleares do sangue periférico humano foi utilizada a droga clastogênica ativa, metilmetanosulfonato (MMS), que não exige ativação metabólica para desempenhar seus efeitos genotóxicos. MMS também foi empregado para o ensaio cometa de ambos os tipos celulares, conforme indicado pela OECD TG 489 (2014). Resultados obtidos em estudo de Valentin-Severin e colaboradores (2003) comprovam a eficácia dos controles selecionados para cada teste.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO GERANIOL

As concentrações de geraniol utilizadas nos experimentos foram determinadas através do ensaio colorimétrico quantitativo baseado no sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-

dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. O teste se baseia na redução do anel de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, gerando um produto de coloração azul, denominado cristais de formazan, que pode ser medido espectrofotometricamente. As densidades ópticas obtidas são diretamente proporcionais ao número de células vivas (MOSMANN, 1983), sendo apresentados os dados em porcentagem.

Dessa forma, células mononucleares do sangue periférico humano e células HepG2 foram cultivadas, respectivamente, a uma concentração de  $2 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$ , durante 24 horas, em placas de cultura de 96 poços contendo 250  $\mu$ L do respectivo meio de cultura completo, por poço. Após esse período, o meio foi descartado e as células foram expostas ao geraniol, em triplicata para cada uma das seguintes concentrações: 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 175, 250, 500 e 1000  $\mu$ g/mL, sendo que a cada poço foi adicionado novo meio suplementado até completar o volume máximo de 250  $\mu$ L. Como controle negativo foi empregada a solução de Tween 80 a 8%, utilizada como veículo para diluição do geraniol. Triton X-100 (Sigma-Aldrich) diluído na concentração de 1% em meio RPMI-1640 (para células mononucleares) e em meio MEM (para HepG2) foi utilizado como controle positivo. Um branco de reativos foi preparado, também em triplicata, contendo apenas meio de cultura sem soro.

Finalizadas as 24 horas, o sobrenadante de todos os poços foi descartado e, em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de MTT em cada poço. As placas foram incubadas por mais 4 horas. O MTT (invitrogen™, Lot: 1178042) sofreu uma diluição inicial em PBS (5 mg/mL), obtendo a solução estoque, que foi filtrada e esterilizada em filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m (Millex®, Merck). A solução de uso (0,5 mg/mL) foi obtida pela diluição dessa solução estoque em meio RPMI-1640 (para células mononucleares) ou em meio MEM (para células HepG2), na proporção de 1:9 (v/v). Ao término das 4 horas, o MTT foi retirado dos poços, e foram adicionados 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para a solubilização dos cristais de formazan, agitando a placa por pelo menos 15 minutos. Em seguida, deu-se prosseguimento à leitura em espectrofotômetro de microplacas (Epoch-BioTek®), em comprimento de onda de 550 nm. O percentual de células viáveis foi obtido através do seguinte cálculo:

$$\frac{(\text{Média das absorvâncias de cada exposição} - \text{Média das absorvâncias do branco})}{(\text{Média das absorvâncias do controle negativo} - \text{Média das absorvâncias do branco})} \times 100$$

#### 4.8 ENSAIO COMETA

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada controle e concentração de geraniol, para os dois tipos celulares, de acordo com a técnica descrita por Singh et al. (1988) e Klaude et al. (1996), com modificações. As lâminas utilizadas no teste foram previamente preparadas com uma fina camada de agarose ultrapura 1,5% (Invitrogen®), para a aderência celular. Após secagem *overnight*, foram estocadas em geladeira até o momento do uso.

Células mononucleares do sangue periférico e células HepG2 foram cultivadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$ , em placa de 24 poços contendo, respectivamente, meio RPMI-1640 completo e meio MEM completo, durante 24 horas. Após, as células foram expostas ao geraniol nas concentrações determinadas nos testes de citotoxicidade para cada tipo celular, durante 4 horas. MMS (Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) foi empregado como controle positivo na concentração de 45  $\mu\text{M}$ . Para o controle negativo, foram pipetados 20  $\mu\text{L}$  da solução de Tween 80 a 8%.

Ao final das 4 horas de exposição ao geraniol, as células do sangue periférico foram transferidas para tubos de centrifuga, e os poços foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de PBS (37 °C), que foram reservados aos respectivos tubos, para centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Já para células aderentes, como a HepG2, é preciso realizar um tratamento prévio com tripsina, para despregar as células aderidas. Para tanto, foi desprezado o meio de cultura dos poços e as células também foram lavadas com PBS, duas vezes, descartando-o, ao final. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de tripsina EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich) foram adicionados aos poços, e a placa foi incubada por 5 minutos. Após, com as células já despregadas, a tripsina foi neutralizada com 1,5 mL de meio MEM com soro. A suspensão celular de cada poço foi, então, transferida para tubos de centrifuga, que foram centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante de todos os tubos foi descartado, restando aproximadamente 100 microlitros para ressuspender os pellets. Os demais procedimentos são comuns para ambos os tipos celulares.

Cerca de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de cada tubo foram misturados a 100  $\mu\text{L}$  de agarose LMP 5% (Invitrogen®) – previamente preparada –, a 37 °C, e mesmo volume foi depositado sobre a lâmina pré-coberta com agarose ultrapura 1,5%, sendo, em seguida, coberta com lamínula. As lâminas foram levadas para refrigeração a 4°C, por pelo menos 20 minutos, para endurecimento da agarose. Finalizado esse tempo, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente, e as lâminas acondicionadas em cuba contendo solução de lise (NaCl 2,5 M,

EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton x-100 e DMSO, pH 10), em refrigerador (4 °C), durante pelo menos 1 hora, protegidas da luz para que não ocorressem danos adicionais ao DNA.

Após o tempo de lise, em sala escura, as lâminas foram transferidas cuidadosamente para a cuba horizontal de eletroforese, preenchendo o máximo possível dos espaços. O tampão de eletroforese foi adicionado lentamente até cobri-las. Antes de iniciar a corrida eletroforética, deixamos o DNA desnaturando em tampão alcalino (pH>13) durante 20 minutos. Finalizada a desnaturação, a corrida de eletroforese foi realizada durante 20 minutos, em baixa voltagem (25V) e 300 miliampère, e com a cuba mergulhada em recipiente com gelo (4 °C).

Concluída a corrida, as lâminas foram retiradas cuidadosamente e encaminhadas para a neutralização em 5 mL de solução de Tris 0,4 M (pH 7,5), durante 5 minutos. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. As lâminas foram deixadas secando durante 15 minutos, em temperatura ambiente, para, em seguida, serem fixadas em etanol absoluto durante 10 minutos. Ao término do procedimento, as lâminas foram estocadas em geladeira para posterior análise.

No momento da análise, foram adicionados à lâmina 100 µL de solução de brometo de etídio 200 µg/mL a 1%, e a mesma foi coberta com lamínula. O brometo de etídio é um agente intercalante, fluorescente, capaz de se associar ao DNA. Para visualização dos danos no DNA, as lâminas foram observadas imediatamente após coloração, em aumento de 400x, usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em sala escura para não perder a fluorescência do corante. Foram analisadas 100 células de cada tratamento/repetição, para cada tipo celular, de acordo com a intensidade da cauda, classificando-as em: 0 - sem dano; 1 - dano pequeno, cauda menor que o diâmetro da cabeça; 2 - dano médio, cauda 1 ou 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; e 3 - dano máximo, cauda maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça (Figuras 6 e 7). Por fim, foi determinado o escore, isto é, o somatório da multiplicação do número de células identificadas em cada classe pelo valor da classe, sendo que esse resultado varia de 0 (sem dano) a 300 (dano severo). Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas.

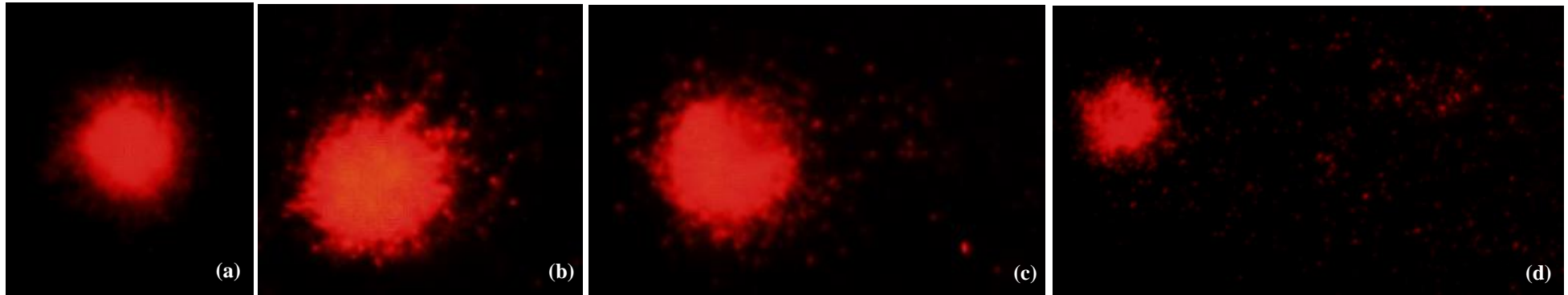


Figura 7 – Classes de danos em células mononucleares do sangue periférico humano avaliadas pelo Ensaio Cometa: (a) dano 0, (b) dano 1, (c) dano 2, (d) dano 3.

Aumento final: 400x.

Fonte: Arquivo pessoal.

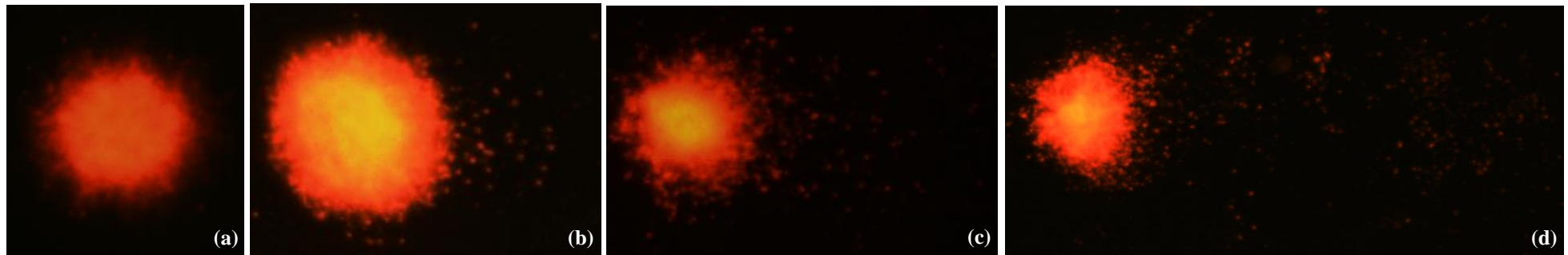


Figura 8 – Classes de danos em células de hepatocarcinoma humano HepG2 avaliadas pelo Ensaio do Cometa: (a) dano 0, (b) dano 1, (c) dano 2, (d) dano 3.

Aumento final: 400x.

Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.9 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN)

Foi empregada a metodologia do Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese descrita por Fenech (2000). Os experimentos foram realizados em duplicata, em linfócitos; e triplicata para a HepG2, para controles e cada concentração de geraniol.

Para as culturas de linfócitos, foram coletados 10 mL de sangue periférico de 2 voluntários, de ambos os sexos, em seringa heparinizada, a qual permaneceu em repouso, na vertical, por no máximo 4 horas, ou até que o sangue decantasse, produzindo um volume suficiente de plasma para uso em cultura. Tubos de cultura de face plana de 10 cm<sup>2</sup> (TPP®) foram preparados com 5 mL de meio RPMI 1640 completo, acrescido de 5 µg/mL de fitohemaglutinina A, para estimular a divisão dos linfócitos, sendo que 0,5 mL de plasma foi adicionado a cada frasco, seguido de 6 a 8 gotas do concentrado de eritrócitos. Os frascos foram homogeneizados e incubados por 72 horas. A exposição ao geraniol foi realizada 44 horas após a incubação (células na fase S, G2 e M do ciclo celular são mais sensíveis aos efeitos genotóxicos), com as diferentes concentrações de geraniol previamente determinadas no teste do MTT. Como controle positivo foi utilizado 150 µM de MMS (Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3); e como controle negativo, 50 µL da solução de Tween 80 a 8%. Citocalasina-B (6 µg/mL) foi adicionada em cada frasco de cultura 4 horas após os tratamentos com a substância teste (24 horas antes do término das 72 horas (T = 48h)). Ao final, cada suspensão celular foi transferida para respectivos tubos de centrifuga.

Para HepG2, garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP®) foram preparados com 5 mL de meio MEM completo e um volume correspondente a  $2 \times 10^5$  de células. Os frascos foram incubados por 76 horas. A exposição ao geraniol foi realizada 24 horas após a incubação, com as concentrações previamente determinadas no teste do MTT. Como controle positivo foi utilizado 2 µM de BaP (Molecular Probes™, Lot: 1178042); e como controle negativo, 50 µL da solução de Tween 80 a 8%. Finalizadas as 24h, o meio de cultivo de todos os frascos foi desprezado, e todas as células foram lavadas com 5 mL de PBS, seguido de seu descarte. Novo meio de cultura completo foi adicionado a cada frasco juntamente com a citocalasina-B (6 µg/mL), e seguimos com a incubação por mais 28 horas. Finalizado esse tempo, o meio de cultura de cada frasco foi colocado em tubos de centrifuga identificados, e os frascos foram lavados duas vezes com 5 mL de PBS, sendo que a primeira lavagem foi destinada aos respectivos tubos. Tripsina EDTA 0,5% (1 mL) foi adicionada a cada frasco, por 5 minutos (37 °C), para desprendimento das células. Em seguida, o meio reservado nos tubos de

centrífuga foi utilizado em seus respectivos frascos para neutralização da tripsina. E, ao final, a suspensão celular foi transferida novamente para cada tubo de centrífuga.

As culturas foram centrifugadas (1000 rpm, linfócitos; 1500 rpm, HepG2) durante 5 minutos e os pellets suspensos em solução hipotônica de KCL 0.075 M, para linfócitos; e solução de citrato de sódio (10 mg/mL), para HepG2, a 4 °C, durante 5 minutos. Novamente, as células foram centrifugadas durante 5 minutos, e fixadas em mistura de metanol:ácido acético (3:4, linfócitos; 3:1, HepG2) gelada. Gotas de formaldeído (4%) foram adicionadas nesta fixação para preservação do citoplasma. O processo de fixação foi realizado mais 2 vezes. Para linfócitos, com fixador metanol:ácido acético (5:1). Ao final, o pellet foi homogeneizado e as lâminas preparadas por gotejamento e coradas com Giemsa a 10% por 10 minutos.

As análises foram realizadas em microscópio de luz com aumento de 400x, contando um total de 1000 células por concentração/repetição, anotando a presença de micronúcleo, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (Figuras 8 e 9). Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas. Como uma medida adicional de citotoxicidade, foi calculado o Índice de Divisão Nuclear (IDN), seguindo a fórmula:  $IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$ , em que M1-M4 indicam o número de células de 1 a 4 núcleos (Figuras 10 e 11) avaliadas em 500 células (N) – para cada concentração/repetição.

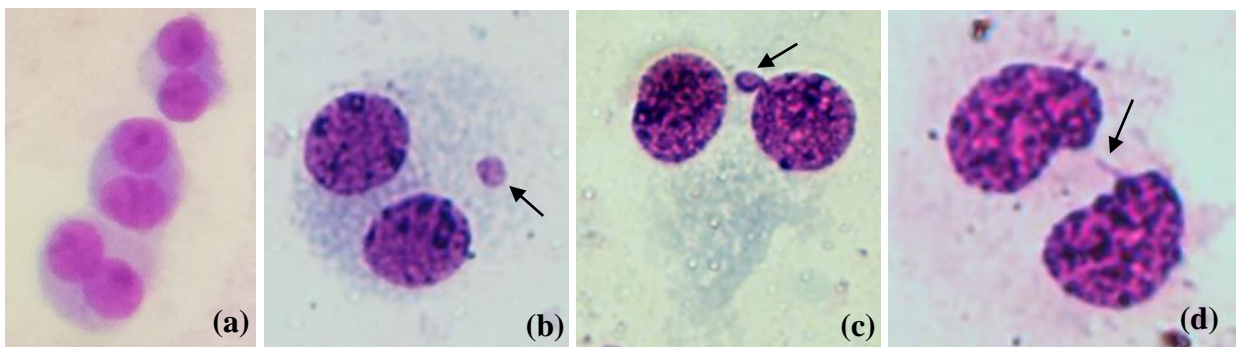


Figura 9 – Linfócitos binucleados do sangue periférico humano, alterações apontadas pelas setas: (a) células normais, (b) célula com micronúcleo (MN), (c) célula com broto nuclear (BN), (d) célula com ponte nucleoplasmática (PNP).

Fonte: Arquivo pessoal.

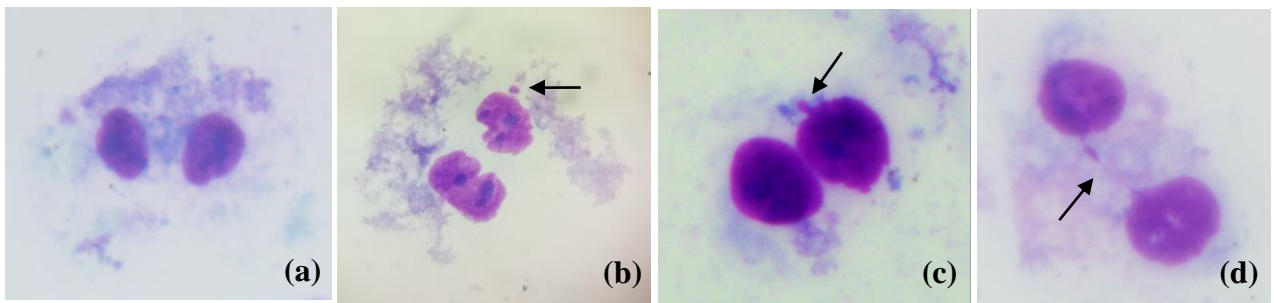


Figura 10 – Células de hepatocarcinoma humano HepG2, alterações apontadas pelas setas: (a) célula normal, (b) célula com micronúcleo (MN), (c) célula com broto nuclear (BN), (d) célula com ponte nucleoplasmática (PNP).  
Fonte: Arquivo pessoal.

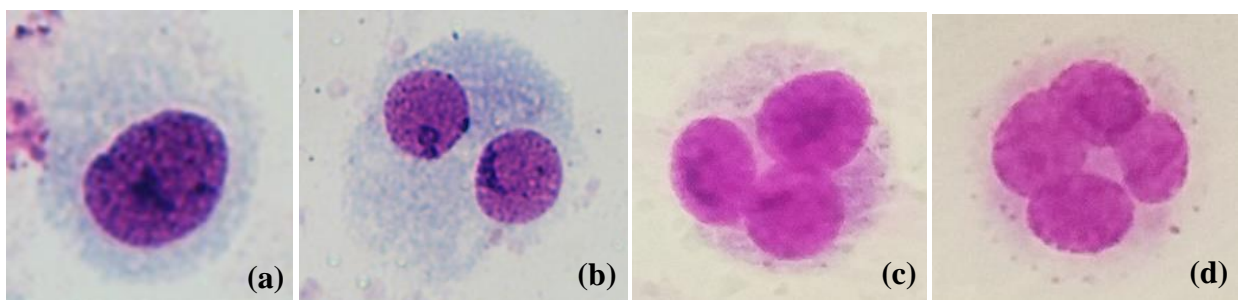


Figura 11 – Linfócitos do sangue periférico humano classificados na determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), de acordo com o número de núcleos, em: (a) mononucleado, (b) binucleado, (c) trinucleado, (d) tetranucleado.  
Fonte: Arquivo pessoal.

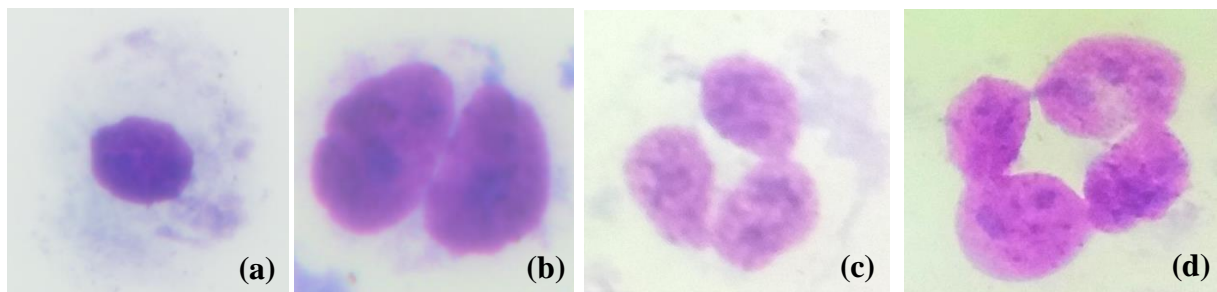


Figura 12 – Células de hepatocarcinoma humano HepG2 classificadas na determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), de acordo com o número de núcleos, em: (a) mononucleada, (b) binucleada, (c) trinucleada, (d) tetranucleada.  
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.10 FORMAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os dados obtidos foram submetidos a cálculos estatísticos empregando a análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas, com a utilização do software GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 (versão 5.02). Os resultados da comparação entre os controles e a exposição às diferentes concentrações do geraniol foram considerados significativos com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTE DO MTT

Através do ensaio colorimétrico quantitativo com o sal de tretazólio MTT, foi possível avaliar o potencial citotóxico do geraniol frente células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), tendo sido escolhidas para os ensaios de genotoxicidade, as concentrações com resultados de viabilidade celular  $\geq 80\%$ .

Em PBMC, concentrações igual ou abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram mais de 90% de células viáveis. No entanto, ocorreu uma redução drástica e repentina na viabilidade celular a partir da concentração de 175  $\mu\text{g/mL}$ , cujo número de células viáveis foi de 19,08%, seguido de percentuais menores para as demais concentrações, ocorrendo morte completa em 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Sendo assim, em células mononucleares do sangue periférico humano, foi possível selecionar as concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para serem estudadas nos testes genético-toxicológicos.

Mesmo cenário foi observado quando avaliamos o efeito de diferentes concentrações de geraniol sobre células HepG2: acentuada diminuição no percentual de células viáveis a partir da concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  – com viabilidade de 2,09% –, seguido de percentuais menores para as demais concentrações, igualmente ocorrendo morte completa na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Concentrações acima de 5  $\mu\text{g/mL}$  de geraniol reduzem a viabilidade celular em HepG2, apresentando valores menores que 80%, entretanto, com uma diminuição gradual em viabilidade a partir da concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  (72,56%) até 100  $\mu\text{g/mL}$  (58,22%). Sendo assim, só foi possível escolher para os ensaios de avaliação de toxicidade genética do geraniol em HepG2, as concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Nas tabelas 1 e 2 constam as médias  $\pm$  desvios-padrão das absorbâncias obtidas no teste do MTT para, respectivamente, células mononucleares do sangue periférico humano e células HepG2. A partir desses dados, foram obtidos os respectivos percentuais de células viáveis para ambos os tipos celulares (Figuras 12 e 13).

Tabela 1 – Média  $\pm$  DP das absorvâncias obtidas através do teste do MTT em células mononucleares do sangue periférico humano expostas a diferentes concentrações de geraniol (em  $\mu\text{g/mL}$ ), em um período de 24 horas.

| <b>Exposições</b> | <b>Absorvâncias (Média <math>\pm</math> DP)</b> |
|-------------------|---|
| Branco            | 0,0676 $\pm$ 0,0025*                            |
| Controle negativo | 0,4450 $\pm$ 0,0669                             |
| Triton X-100 a 1% | 0,1077 $\pm$ 0,0380*                            |
| 2,5               | 0,4193 $\pm$ 0,0592                             |
| 5                 | 0,4777 $\pm$ 0,0993                             |
| 10                | 0,4767 $\pm$ 0,0593                             |
| 25                | 0,4553 $\pm$ 0,0333                             |
| 50                | 0,4293 $\pm$ 0,0323                             |
| 100               | 0,5180 $\pm$ 0,0735                             |
| 175               | 0,1397 $\pm$ 0,0586*                            |
| 250               | 0,0723 $\pm$ 0,0083*                            |
| 500               | 0,0710 $\pm$ 0,0157*                            |
| 1000              | 0,0676 $\pm$ 0,0092*                            |

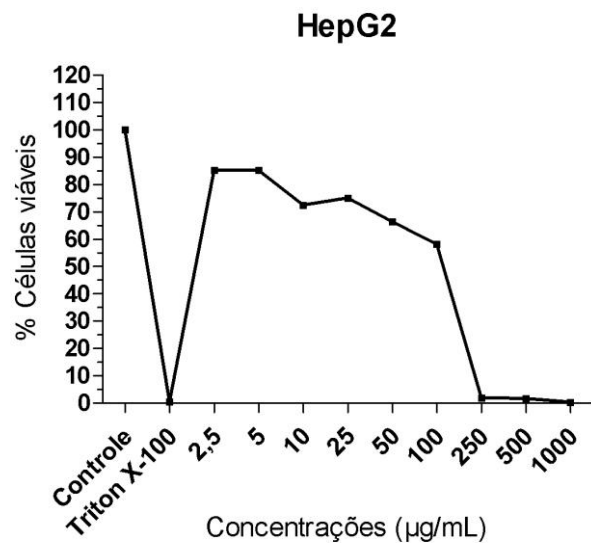
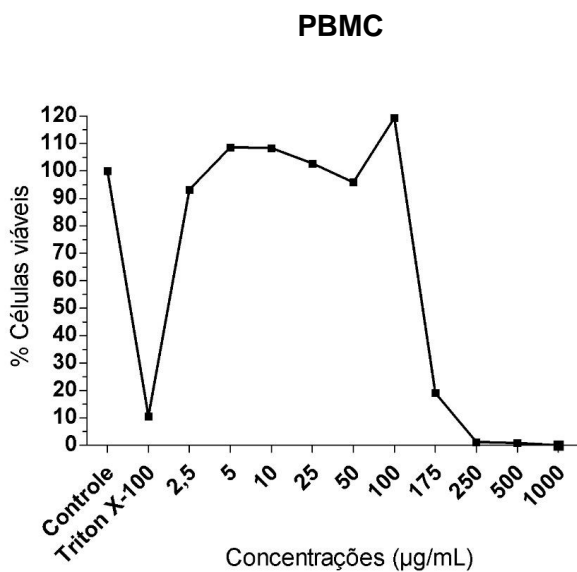
DP = Desvio-padrão. Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo: \*( $p < 0,001$ ).

Tabela 2 – Média  $\pm$  DP das absorbâncias obtidas através do teste do MTT em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) expostas a diferentes concentrações de Geraniol (em  $\mu\text{g/mL}$ ), em um período de 24 horas.

| Exposições        | Absorbâncias (Média $\pm$ DP) |
|-------------------|-------------------------------|
| Branco            | 0,0663 $\pm$ 0,0055**         |
| Controle negativo | 3,3790 $\pm$ 0,0325           |
| Triton X-100 a 1% | 0,0833 $\pm$ 0,0090**         |
| 2,5               | 2,8900 $\pm$ 0,2159           |
| 5                 | 2,8890 $\pm$ 0,3550           |
| 10                | 2,4700 $\pm$ 0,3824**         |
| 25                | 2,5560 $\pm$ 0,2593*          |
| 50                | 2,2690 $\pm$ 0,3290**         |
| 100               | 1,9950 $\pm$ 0,2910**         |
| 250               | 0,1357 $\pm$ 0,1198**         |
| 500               | 0,1237 $\pm$ 0,0747**         |
| 1000              | 0,0810 $\pm$ 0,0034**         |

DP = Desvio-padrão. Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo: \*( $p < 0,01$ ), \*\*( $p < 0,001$ ).

Figuras 13 e 14 – Percentual de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) viáveis após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de geraniol ( $\mu\text{g/mL}$ ), avaliados pelo teste do MTT.



## 5.2 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DO GERANIOL (ENSAIO COMETA)

Os resultados obtidos na avaliação de genotoxicidade do geraniol pelo Ensaio Cometa estão apresentados nas tabelas 3 e 4. Tanto para células mononucleares do sangue periférico (Tabela 3), quanto para as células HepG2 (Tabela 4), nenhuma das concentrações testadas apresentou um aumento estatisticamente significativo no número de células com danos e em seus escores. Conforme esperado, os compostos utilizados como controle positivo produziram, em ambos os tipos celulares, um aumento estatisticamente significativo no número de células com danos ao DNA, em comparação ao controle negativo, com escore próximo a 300 ( $292,30 \pm 11,11$ ) o que comprova a sensibilidade do teste na detecção de compostos genotóxico, viabilizando-o.

Tabela 3 – Migração do DNA (Média  $\pm$  DP) em células mononucleares do sangue periférico humano, avaliada pelo Ensaio do Cometa, após 4 horas de exposição a diferentes concentrações de geraniol, *in vitro*.

| Tratamentos               | Classes do Cometa             |                  |                  |                  |                  | Escore                          |
|---------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|
|                           | Total <sup>1</sup>            | 0                | 1                | 2                | 3                |                                 |
| Controle (Tween 80 a 8%)  | 8,67 $\pm$ 5,16               | 91,33 $\pm$ 5,16 | 6,33 $\pm$ 4,50  | 2,16 $\pm$ 1,16  | 0,16 $\pm$ 0,40  | 11,00 $\pm$ 6,13                |
| Geraniol [10 $\mu$ g/mL]  | 6,33 $\pm$ 1,50               | 93,67 $\pm$ 1,50 | 6,00 $\pm$ 1,41  | 0,00 $\pm$ 0,00  | 0,33 $\pm$ 0,51  | 7,00 $\pm$ 2,09                 |
| Geraniol [25 $\mu$ g/mL]  | 3,33 $\pm$ 2,80               | 96,67 $\pm$ 2,80 | 1,66 $\pm$ 1,36  | 0,166 $\pm$ 0,40 | 1,50 $\pm$ 1,37  | 6,50 $\pm$ 5,61                 |
| Geraniol [50 $\mu$ g/mL]  | 12,83 $\pm$ 5,38              | 86,50 $\pm$ 5,05 | 8,66 $\pm$ 5,88  | 2,33 $\pm$ 0,81  | 1,83 $\pm$ 1,32  | 18,83 $\pm$ 6,14                |
| Geraniol [100 $\mu$ g/mL] | 9,33 $\pm$ 2,06               | 90,67 $\pm$ 2,06 | 3,33 $\pm$ 2,42  | 1,66 $\pm$ 1,21  | 4,33 $\pm$ 2,33  | 19,67 $\pm$ 5,57                |
| MMS [45 $\mu$ M]          | 99,83 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup> | 0,166 $\pm$ 0,40 | 0,833 $\pm$ 1,60 | 5,50 $\pm$ 8,21  | 93,50 $\pm$ 9,64 | 292,30 $\pm$ 11,11 <sup>a</sup> |

DP = Desvio-padrão. Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo: <sup>a</sup>( $P < 0,001$ ). <sup>1</sup>Número total de células com danos (classes 1 + 2 + 3). MMS, metilmetanosulfonato.

Tabela 4 – Migração do DNA (Média ± DP) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), avaliada no Ensaio do Cometa, após 4 horas de exposição a diferentes concentrações de geraniol, *in vitro*.

| Tratamentos              | Classes do Cometa         |              |             |               |               | Scores                      |
|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|-----------------------------|
|                          | Total <sup>1</sup>        | 0            | 1           | 2             | 3             |                             |
| Controle (Tween 80 a 8%) | 7,33 ± 1,15               | 92,67 ± 1,15 | 7,33 ± 1,15 | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00   | 7,33 ± 1,15                 |
| Geraniol [1,,25 µg/mL]   | 4,66 ± 1,52               | 95,33 ± 1,52 | 3,66 ± 1,52 | 1,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00   | 5,66 ± 1,52                 |
| Geraniol [2,5 µg/mL]     | 8,66 ± 5,68               | 91,33 ± 5,68 | 7,33 ± 4,93 | 1,00 ± 1,00   | 0,33 ± 0,57   | 10,33 ± 6,50                |
| Geraniol [5 µg/mL]       | 4,00 ± 1,73               | 96,00 ± 1,73 | 3,33 ± 1,15 | 0,66 ± 0,57   | 0,00 ± 0,00   | 4,66 ± 2,30                 |
| MMS [45 µM]              | 99,33 ± 0,57 <sup>a</sup> | 0,66 ± 0,57  | 7,33 ± 3,78 | 34,00 ± 14,00 | 58,00 ± 16,37 | 249,30 ± 18,56 <sup>a</sup> |

DP = Desvio-padrão. Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo: <sup>a</sup>(P<0,001). <sup>1</sup>Número total de células com danos (classes 1 + 2 + 3). MMS, metilmetanosulfonato.

### 5.3 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DO GERANIOL (TESTE DO MN)

Nas tabelas 5 e 6 estão apresentados os resultados da avaliação de clastogenicidade/aneugenicidade do geraniol, respectivamente, em linfócitos do sangue periférico humano e em células HepG2, através do Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN). A frequência de células binucleadas com MN foi determinada a partir do total de células analisadas (2000 células para linfócitos; 3000 células para HepG2), não tendo sido deduzido o número de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares por ventura encontrados (dados apresentados nas tabelas).

Similarmente aos resultados do ensaio cometa, em CBMN nenhuma das concentrações testadas apresentou efeito mutagênico em linfócitos humanos (Tabela 5) e em células HepG2 (Tabela 6), portanto, os resultados obtidos para os dois tipos celulares não diferiram significativamente do controle negativo. A análise do índice de divisão nuclear (IDN) apontou um decréscimo significativo na divisão celular apenas de linfócitos expostos a 100 µg/mL de geraniol (Tabela 5), o que indica um possível efeito citotóxico desta concentração quando administrada por um longo período – 28 horas para o teste do micronúcleo, 4 horas a mais de exposição em comparação ao teste do MTT. Mesma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo foi observada para o IDN do controle positivo (2 µM de benzo(a)pireno). Em HepG2, por outro lado, os valores de IDN (Tabela 6) mantiveram-se estatisticamente semelhante ao controle negativo, o que exclui qualquer indício de citotoxicidade para as concentrações testadas. Conforme esperado, os compostos utilizados como controle positivo produziram, em ambos os tipos celulares, um

aumento estatisticamente significativo no número de células com MN, em comparação ao controle negativo, o que comprova a sensibilidade do teste do MN com bloqueio da citocinese na detecção de compostos mutagênicos.

Tabela 5 – Frequência de Micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos do sangue periférico humano, após exposição a diferentes concentrações de geraniol, *in vitro*, durante 28 horas.

| Substância teste                     | Exposição                             |                | Células binucleadas      |                    |     |    | IDN<br>(1000 células)        |
|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------|--------------------|-----|----|------------------------------|
|                                      |                                       |                | Com MN<br>(2000 células) |                    | PNP | BN |                              |
|                                      | Concentrações<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Período<br>(h) | Nº                       | %                  | Nº  | Nº | (Média $\pm$ DP)             |
| Controle negativo<br>(Tween 80 a 8%) | -                                     | 28             | 20                       | 1,00               | 0   | 6  | 1,81 $\pm$ 0,09              |
| Controle positivo<br>(MMS)           | 150*                                  | 28             | 317 <sup>a</sup>         | 15,85 <sup>a</sup> | 10  | 33 | 1,57 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup> |
| Geraniol                             | 10                                    | 28             | 25                       | 1,25               | 4   | 12 | 1,71 $\pm$ 0,07              |
|                                      | 25                                    | 28             | 10                       | 0,50               | 0   | 5  | 1,71 $\pm$ 0,00              |
|                                      | 50                                    | 28             | 21                       | 1,05               | 2   | 1  | 1,72 $\pm$ 0,02              |
|                                      | 100                                   | 28             | 17                       | 0,85               | 2   | 5  | 1,50 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> |

\*Concentração em  $\mu\text{M}$ . Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo: <sup>a</sup>( $p < 0,05$ ), <sup>b</sup>( $p < 0,001$ ). IDN = índice de divisão nuclear. MMS, metilmetanosulfonato.

Tabela 6 – Frequência de Micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), após exposição a diferentes concentrações de geraniol, *in vitro*, durante 24 horas.

| Substância teste                      | Exposição                             |                | Células binucleadas      |                   |     |    | IDN<br>(1500 células) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------|-------------------|-----|----|-----------------------|
|                                       |                                       |                | Com MN<br>(3000 células) |                   | PNP | BN |                       |
|                                       | Concentrações<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Período<br>(h) | Nº                       | %                 | Nº  | Nº | (Média $\pm$ DP)      |
| Controle negativo<br>(Tween 80 a 8%)  | -                                     | 24             | 45                       | 1,50              | 15  | 39 | 1,38 $\pm$ 0,02       |
| Controle positivo<br>(Benzo(a)pireno) | 2*                                    | 24             | 184 <sup>a</sup>         | 6,13 <sup>a</sup> | 41  | 61 | 1,43 $\pm$ 0,13       |
| Geraniol                              | 1,25                                  | 24             | 34                       | 1,13              | 4   | 22 | 1,34 $\pm$ 0,05       |
|                                       | 2,5                                   | 24             | 24                       | 0,80              | 4   | 35 | 1,35 $\pm$ 0,07       |
|                                       | 5                                     | 24             | 23                       | 0,76              | 10  | 28 | 1,36 $\pm$ 0,04       |

\*Concentração em  $\mu\text{M}$ . Análise de variância one-way ANOVA, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas: <sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ ). IDN = índice de divisão nuclear.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do geraniol sobre células humanas em cultura, a fim de atestar a segurança de seu uso em humanos. Para tanto, foram utilizados dois modelos distintos de células humanas: células normais, mononucleares, extraídas de sangue periférico humano, e que não possuem enzimas de ativação de xenobióticos; e uma linhagem de células aderentes transformadas, derivadas de hepatocarcinoma humano, denominadas HepG2, as quais sabidamente contêm uma variedade de enzimas de metabolização do fígado.

Nossos resultados mostraram que o geraniol pode reduzir a viabilidade celular, de maneira dose-dependente em células HepG2, enquanto manteve um alto número de células mononucleares viáveis, reduzindo drasticamente a viabilidade apenas quando empregadas concentrações  $\geq 175 \mu\text{g/mL}$ . Diversos estudos atribuem potente ação citotóxica de monoterpenos, inclusive do geraniol, em células tumorais (CROWELL, 1999; BAKKALI et al., 2008; VIEIRA et al., 2011; CRESPO et al., 2012; BAYALA et al., 2014; SOBRAL et al., 2014; LEE et al., 2016). Considerando que a HepG2 é uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano, a redução observada no percentual de células viáveis a partir da concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$  de geraniol poderia ser assim justificada, tendo em vista que não obtivemos mesmo padrão de citotoxicidade quando empregadas células normais. A diminuição na proliferação celular e o aumento de apoptose em células HepG2, segundo estudo de Crespo et al. (2012), estariam relacionados ao efeito inibitório tanto da via do mevalonato quanto da biossíntese de fosfatidilcolina, ambos promovido pelo geraniol ( $50$  e  $200 \mu\text{M}$ ). A primeira, desempenha papel crucial na síntese de colesterol, requeridos para o rápido crescimento de células cancerígenas e sua proliferação; e, a segunda, é uma via associada à apoptose.

Usta e colaboradores (2009), também pelo teste do MTT, obtiveram viabilidade de 67% para células HepG2 expostas à elevada concentração de  $100 \mu\text{M}$  de geraniol. Quando mesma concentração foi empregada para o mirceno, monoterpeno análogo ao geraniol, a viabilidade em HepG2 foi reduzida para 26%. Contudo, o composto mais potente, dentre os estudados, em reduzir a viabilidade celular em HepG2 foi o linalol – outro análogo ao geraniol –, resultando em 100% e 50% de células mortas para as concentrações de  $2$  e  $0,4 \mu\text{M}$  de linalol, respectivamente (USTA et al., 2009). Conforme observado para o geraniol em nossa avaliação, diminuição significativa em viabilidade ocorreu com concentrações crescentes de linalol, que foi responsável por inibir os complexos I e II da cadeia de

transportes de elétrons da mitocôndria, promovendo uma redução nos níveis de ATP, fonte de energia para os processos de reparo e regulação de componentes intracelulares; além de proporcionar um aumento no nível intracelular de espécies reativas de oxigênio, eventos que promoveram a morte de células HepG2 (USTA et al., 2009). Esses resultados corroboram com nossos dados, indicando que o geraniol e monoterpenos semelhantes possuem a capacidade de reduzir a viabilidade de células de hepatocarcinoma humano. Conseqüentemente, em nosso estudo só foi possível selecionar concentrações muito baixas do geraniol (5, 2,5 e 1,25 µg/mL) para os testes genéticos, diferindo das concentrações obtidas para as células mononucleares do sangue periférico humano. Sendo assim, é possível inferir que a HepG2 não seja o modelo celular metabolizador mais adequado para estudos genético-toxicológicos de monoterpenos, tendo em vista que sua ação citotóxica específica sobre células tumorais permitirá a seleção de concentrações baixas desse monoterpeno, reduzindo as possibilidades de investigação de toxicidade genética e correlação dos resultados obtidos. Conforme constatamos para as células mononucleares do sangue periférico humano, não foi mantido mesmo padrão de citotoxicidade quando empregadas células não-tumorais.

O uso de um agente metabolizador, como a fração S9 (fração microsossomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254 ou de fígado humano), junto a células normais – por exemplo, leucócitos – poderia ser uma alternativa, tornando possível a comparação do efeito direto e indireto (com metabolização) de mesmas concentrações de monoterpenos sobre o DNA. Uma outra possibilidade é o emprego de hepatócitos humanos primários, que mostraram alta sensibilidade na metabolização de mutágenos indiretos, conforme estudo de Wilkening, Stahl e Bader (2003), embora seja necessário superar suas limitações: escassez de material obtido de fígado humano, ausência de proliferação e perda da atividade metabolizadora após algumas semanas. Segundo os autores, os hepatócitos primários traduzem com mais fidelidade a biotransformação ocorrida no fígado humano, expressando níveis mais elevados de enzimas de fase I, quando comparados a HepG2. Além disso, constataram nesta uma expressão superior das enzimas de fase II – SUL1A1 e NQO1 –, o que pode resultar em um falso negativo em estudos de mutação, diante da atuação de um número relativamente maior de enzimas, em comparação àquelas presentes em hepatócitos, na detoxificação do composto-teste (WILKENING; STAHL; BADER, 2003).

Estudo recente de Sinha e colaboradores (2014) avaliaram 6 concentrações de geraniol (100, 200, 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL) em linfócitos humanos, através do teste por exclusão com azul de trypan e do ensaio do MTT. Em ambos os testes, não foi constatado efeito citotóxico do geraniol, o que difere de nosso estudo para as concentrações acima de 100



$\mu\text{g/mL}$ , que promoveram uma drástica diminuição na viabilidade de células mononucleares do sangue periférico, ocorrendo morte completa para a concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Essa distinção pode ser justificada pela diferença no tempo de exposição ao geraniol: enquanto empregamos 24h, Sinha e colaboradores (2014) o fizeram durante 3 horas.

A combinação do ensaio cometa com o teste do micronúcleo tem sido sugerida, já que o primeiro identifica lesões genômicas passíveis de correção – quebra de fita simples e dupla e sítios álcali-lábeis no DNA –; enquanto o segundo detecta aberrações cromossômicas, isto é, fragmentos cromossômicos acêntricos advindos de quebras do DNA, ou cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase, ambos sem possibilidade de reparo (VAN GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997). Em nossa avaliação, o geraniol não se mostrou genotóxico (ensaio cometa, após 4 horas de exposição às diferentes concentrações), nem mutagênico (CBMN, após 28 horas de exposição), tanto em células mononucleares do sangue periférico humano, quanto em células HepG2. No entanto, não é possível comparar os resultados obtidos por ação direta do geraniol (células do sangue), com aqueles obtidos por sua ação indireta (células HepG2), em razão de não ter sido possível trabalhar com as mesmas concentrações em ambos os tipos celulares.

Em estudo de Sinha e colaboradores (2014), todas as concentrações (100, 200, 500, 1000, 1500 e  $2000 \mu\text{g/mL}$ ) de geraniol testadas em linfócitos humanos através do ensaio cometa não apresentaram sinal algum de genotoxicidade, com menos de 10% de DNA na cauda até para a concentração mais alta, após 3h de exposição ao monoterpene. Igualmente, em nosso trabalho não constatamos efeito genotóxico do geraniol nem para a maior concentração estudada ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), após 4 horas de exposição.

Doppalapudi e colaboradores (2007) avaliaram a atividade genotóxica de diversos agentes quimiopreventivos através de vários sistemas-teste. Os resultados com geraniol foram negativos para o teste do MN em camundongos e para o teste de Ames, respectivamente nas concentrações de 375, 750 e  $1500 \text{ mg/kg}$ ; e  $9,76\text{--}12,5 \mu\text{g/placa}$  na ausência de S9, e  $19,5\text{--}625 \mu\text{g/placa}$  na presença de S9. Contudo, os autores apontaram como “inconclusivo” o teste de aberração cromossômica em células de ovário de hamster chinês (CHO/CA), pois, em um primeiro ensaio, as concentrações testadas ( $78,1\text{--}156,3 \mu\text{g/mL}$ ) na presença da fração metabolizadora S9, mostraram aumento significativo no número de células com aberração estrutural. No entanto, ao repetir o experimento, não obtiveram os mesmos resultados nem para a mais alta dose testada ( $156,3 \mu\text{g/mL}$ ). Apesar disso, em ambos os experimentos, ocorreu troca entre cromátides-irmãs (0,5-2,5%), não tendo sido observado o mesmo para os controles. Contudo, conforme Villela e colaboradores (2003), a troca entre cromátides-irmãs

não resulta necessariamente em mutação. Este evento seria apenas um indicador de ocorrência de possíveis lesões e reparo da molécula de DNA em células de mamíferos, pois o aumento na possibilidade de erro nas reuniões de cadeias de DNA está diretamente relacionado ao aumento no número de permutas induzidas pelo agente testado (VILLELA et al., 2003).

Geraniol diluído em DMSO, em concentração de 0,125 mg/mL (125 µg/mL), foi aplicado em linhagem de células de fibroblastos de hamster chinês (CHL), para realização do teste de aberração cromossômica sem ativação metabólica. Os resultados apontaram células com poliploidia (8%) e aberração cromossômica (4%). No entanto, o teste de Ames em *Salmonella typhimurium* TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535 e TA1537, utilizando 0,5 mg/placa (500 µg/placa) de geraniol em DMSO, apontou resultado negativo para colônias revertentes, portanto, ausência de efeito mutagênico para o geraniol (ISHIDATE et al., 1984). Outros estudos com bactérias também não constataram evento mutagênico após administração do geraniol. Além disso, células de ovário de hamster chinês CHO-K1 tratadas com esse monoterpeno nas concentrações de 33,3, 100 e 333 µM não apresentaram dano citogenético (LAPCZYNSKI et al., 2008). Pelo contrário, Vieira e colaboradores (2011) apontam efeito protetor do geraniol (25 mg/100g de peso corporal), individualmente ou em combinação com outros isoprenoides, com redução dos danos no DNA da mucosa do cólon de ratos com carcinogênese, avaliadas pelo ensaio cometa.

Apesar de alguns dados contraditórios da literatura, podemos concluir que o geraniol aplicado nas mais diversas concentrações e utilizando variados sistemas-testes e tipos celulares, não apresentou efeito genotóxico, corroborando com os resultados de nosso estudo. Ainda assim, é necessário investigar sua genotoxicidade após ser metabolizado, tendo em vista que não encontramos estudos avaliando a ação indireta desse monoterpeno em células humanas saudáveis e, conforme relatamos, o uso de células metabolizadoras humanas de linhagem tumoral na presente investigação, inviabilizou a análise genotóxica do geraniol em concentrações maiores que 5 µg/mL, devido à acentuada redução na viabilidade celular de HepG2. De qualquer forma, é preciso cautela no uso desse monoterpeno, tendo em vista a possibilidade de citotoxicidade quando empregadas concentrações elevadas, já que houve um decréscimo acentuado na viabilidade celular a partir da concentração de 100 µg/mL não apenas em células tumorais, mas também em células normais.

## REFERÊNCIAS

AHUJA, Y. R.; SARAN, R. Potential of Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay) in Heavy Ion Radiation Biology. **Kamla-Raj**, v. 1, n. 2, 2001.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, I. AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, England, 2008.

BARROS, F. M. C. de et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

BARROS, L. A. et al. In vitro larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecum* sp (Nematoda: Anisakidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 10, 2009.

BAYALA, B. et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical componentes – a review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, 2014.

BHALLA, Y.; GUPTA, V.K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, England, 2013.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Planta Science**, v. 161, n. 5, 2001.

CARNESECCHI, S. et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 298: 197-200, 2001.

CARVALHO, K. I. M. de et al. Geraniol – a flavouring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Germany, 2014.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, 2010.

CRESPO, R. et al. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 91, n. 3, 2012.

CROWELL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J Nutr** 129: 775S-778S, 1999.

DAVARI, H. et al. Study of Radioprotective Effect of Green Tea against Gamma Irradiation Using Micronucleus Assay on Binucleated Human Lymphocytes. **Iran J. Basic Med. Science**, v. 15, n. 5, 2012.

DOPPALAPUDI, R. S. et al. Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 629, n. 2, 2007.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, 2002.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 339, 1995.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, 2000.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A manual of basic technique and specialized applications**. 7 ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2016.

GERSHENZON, J.; KREIS, W. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. In: WINK, M. (edit.). **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. England: Sheffield Academic Press, 1999.

GIBCO. **Cell Culture Basics**. Life technologies, 2015.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

GONTIJO, A. M. de M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

GUS, R. Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. e colab. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: EVANS, H. J.; LLOYD, D.C. (Ed.). **Mutation-Induced Chromosome damage to Man**. Edinburgh: University Press, 1976.

HUSSAIN, M. S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 4, n. 1, 2012.

ISHIDATE, M. et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 8, 1984.

JAVITT, N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **Faseb J.**, v. 4, n. 2, 1990.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, 2001.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, 2011.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, n. 2, 1996.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on geraniol. **Food Chem. Toxicol.** 46(Suppl 11): S160-S170, 2008.

LEE, S. et al. Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. **Cancer Medicine**, 2016.

LEITZMANN, C. Characteristics and health benefits of Phytochemicals. **Forschende Komplementärmedizin**, v. 23, n. 2, 2016.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F. **Essential oils as reagents in green chemistry**. França: Springer, 2014.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Front. Genet.**, v. 4, n. 131, 2013.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos de Biologia Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitorização do Dano Genético em Humanos. In: SILVA, J. da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcançe, 2003.

MADANKUMAR, A. et al. Geraniol modulates tongue and hepatic phase I and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity against experimental oral carcinogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 705, n. 1-3, 2013.

MATTER, B.; SCHIMID, W. Trenimon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.12, 1971.

MENDES, J. **Modulação do efeito mutagênico por fitoestrógenos *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de Mestrado. Londrina: UEL, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Methods**, 1983.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, n. 5, 1991.

OECD TG 487. GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. ***In vitro* mammalian cell micronucleus test**. 2014.

OECD TG 489. GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. 2014.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomycin in contrast to gamma irradiation induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 52, 1987.

PALAZZO, R. P.; MALUF, S. W. Técnicas de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. e colab. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, 2003.

RABELLO-GAY, M. N. **Genética Toxicológica: Bases e Metas**. São Paulo: Instituto Butantan, 1991.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, p. 107-112, 1991.

REKHA, K. R. et al. Geraniol Ameliorates the Motor Behavior and Neurotrophic Factors Inadequacy in MPTP-Induced Mice Model of Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, 2013.

RIEDHAMMER, C.; HALBRITTER, D.; WEISSERT, R. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. **Methods in Molecular Biology**, 2014.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocnologia**. BENEDETTI, Ivone Castilho (trad.). Editorial Premier, 1997.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2001.

SCHINDLER, R. Use of cell culture in pharmacology. **Annual Review of Pharmacology**, v. 9, 1969.

SHARMA, Y.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 26, n. 3, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2001.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n. 1, 1988.

SINHA, S. et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, 2014.

SOBRAL, M.V.; XAVIER, A.L.; LIMA, T.C.; SOUSA, D.P. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **Sci World J**, 2014.

TAKAHASHI, C. S. Teste citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

TICE, R. R. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, 2000.

TIWARI, M.; KAKKAR, P. Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicol In Vitro** 23: 295-301, 2009.

USTA, J. et al. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, n. 1, 2009.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, 2003.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-



tungsten carbide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, 1997.

VIEIRA, A. et al. Efficacy of geraniol but not of B-ionone or their combination for the chemoprevention of rat colon carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 6, 2011.

VILLELA, V. I. et al. Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J. da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alance, 2003.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug metabolism and Disposition**, v. 31, 2003.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: WINK, M. (edit.). **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. England: Sheffield Academic Press, 1999.

YUSUF, A. T. et al. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 468, n. 2, 2000.

ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p. 336.

ZANIN, S. M. W. et al. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (ehl) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, jan-jun 2002.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre-esclarecido (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa na Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Marília, intitulada “Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico do Geraniol em células humanas em cultura”, e gostaríamos que participasse da mesma. Os objetivos desta são: avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do Geraniol, *in vitro*, em linfócitos humanos e em células de hepatoma humano (HepG2), por intermédio dos testes de exclusão por Azul de Trypan e do MTT, do ensaio cometa e do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese. Participar desta pesquisa é uma opção. A única participação dos voluntários será através da doação de 15 mL de sangue periférico. O sujeito doador poderá, a qualquer momento, solicitar que as células coletadas para os experimentos não sejam mais utilizadas na referida pesquisa.

Caso aceite participar deste projeto de pesquisa, gostaríamos que soubesse que:

- a) Sua única participação na pesquisa será na doação de 15 mL de sangue periférico para estabelecimento de cultura temporária de linfócitos;
- b) Nos linfócitos em cultura, será verificado se o Geraniol é capaz de causar citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade;
- c) A divulgação dos resultados científicos será feita através de resumos em Congressos e publicação de artigo científico em periódico internacional, sendo que, em nenhuma etapa, será divulgado o nome dos sujeitos doadores do sangue periférico utilizado para a cultura de linfócitos.

Eu, \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_, autorizo a utilização dos linfócitos do sangue periférico que doei para o desenvolvimento da pesquisa intitulada “Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico do Geraniol em células humanas em cultura” a ser realizada no Laboratório CEPEN, localizado no CEES, Campus II da UNESP de Marília. Declaro ter recebido as devidas explicações sobre os objetivos e procedimentos metodológicos da referida pesquisa e informo que estou ciente que poderei solicitar a qualquer momento que as células por mim doadas não sejam mais utilizadas no referido experimento científico.

Nome do doador do sangue: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através do (s) telefone (s) 34021324 ou 8128-2719, falar com Prof. Dr. Edson Luis Maistro (Coordenador e Orientador do projeto, alocado no departamento de Fonoaudiologia da UNESP, FFC, Marília).

Autorizo,

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



---

Edson Luis Maistro – Docente responsável pelo projeto

---

Doador do sangue

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE MARÍLIA  
Faculdade de Filosofia e Ciências  
*Comitê de Ética em Pesquisa*

### Parecer do Projeto nº. 1009/2014

#### IDENTIFICAÇÃO

- |   |
|---|
| 1. Título do Projeto: Estudo do potencial genotóxico/mutagênico do $\beta$ -mirceno, Citral, Geraniol e Nerol: análises in vitro. |
| 2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:<br>Autor(a): Edson Luis Maistro   |
| 3. Instituição do Pesquisador: Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília  |
| 4. Apresentação ao CEP: 17/04/2014  |
| 5. Apresentar relatório em: Semestralmente durante a realização da pesquisa.  |

#### Objetivos

Avaliar o potencial genotóxico/mutagênico do  $\beta$ -mirceno, do citral, do geraniol e do nerol em linfócitos humanos em cultura, utilizando-se os testes do cometa e micronúcleo com bloqueio de citocinese.

#### SUMÁRIO DO PROJETO

A constante exposição, do homem, a agentes químicos e físicos tem sido uma das grandes preocupações da genética toxicológica, visto que estes agentes podem submetê-lo a efeitos genotóxicos e mutagênicos, que por sua vez podem predispor à carcinogênese. A utilização de produtos naturais na medicina popular resultou, nos últimos anos, em uma gama de trabalhos científicos que avaliassem seus possíveis danos, ou não, sobre a saúde humana. Neste contexto, a farmacologia busca isolar moléculas funcionais destes produtos, visando à busca de novos princípios ativos para desenvolvimento de fármacos. Dentro disso, a genética toxicológica vem avaliando os possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos destas moléculas isoladas de plantas utilizadas na medicina popular. O  $\beta$ -mirceno, o citral, o geraniol e o nerol são substâncias químicas presentes em diversas plantas e vem sendo empregados na indústria de perfumes e alimentos como aromatizantes. A literatura ressalta a importância de estudos que avaliem a genotoxicidade e antigenotoxicidade destes compostos, visto que há certa divergência de dados quando o assunto se trata de níveis de tolerância e alguns estudos relatam uma atividade genotóxica dependendo da dose utilizada. Com base nisso, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial genotóxico/mutagênico do  $\beta$ -mirceno, do citral, do geraniol e do nerol em linfócitos de sangue periférico humano em cultura, utilizando-se o teste do cometa e o teste do micronúcleo

#### COMENTÁRIO DO RELATOR

O projeto está de acordo com as exigências éticas e científicas fundamentais resguardadas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, atendendo


aos itens referentes às implicações da ética em pesquisas que envolvem seres humanos, recomendo a aprovação do mesmo pelo CEP.

**PARECER FINAL**

O CEP da FFC da UNESP após acatar o parecer do membro relator previamente aprovado para o presente estudo e atendendo a todos os dispositivos das resoluções 466/2012 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como também todos os anexos incluídos na pesquisa resolve aprovar o projeto de pesquisa supracitado.

**INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES****DATA DA REUNIÃO**

Homologado na reunião do CEP da FFC da Unesp em 06/08/2014.

  
Simone Aparecida Capellini  
Presidente do CEP

  
José Carlos Miguel  
Diretor da FFC