

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 20/02/2019.



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: Monoterpeno. 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

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

CO₂ – 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

cm² – centímetro quadrado

T – tempo

< – menor

± – mais ou menos

mg/kg – miligrama por quilograma

mg/g – miligrama por grama

g/kg – grama por quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	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
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	GERAL.....	27
3.2	ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	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 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
5	RESULTADOS	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
6	DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre-esclarecido (TCLE)	55
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	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

(C₂₀H₃₂), triterpenos (C₃₀H₄₈) e tetraterpenos (C₄₀H₆₀) 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).

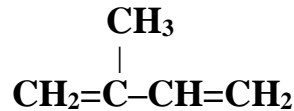


Figura 1 - Fórmula estrutural do isopreno (C₅H₈).

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.

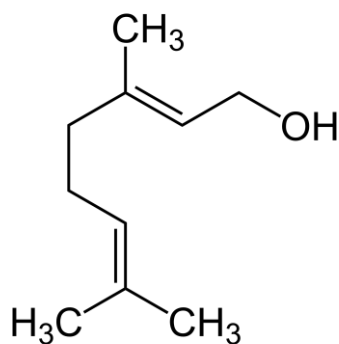


Figura 2 – Estrutura química do Geraniol

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.

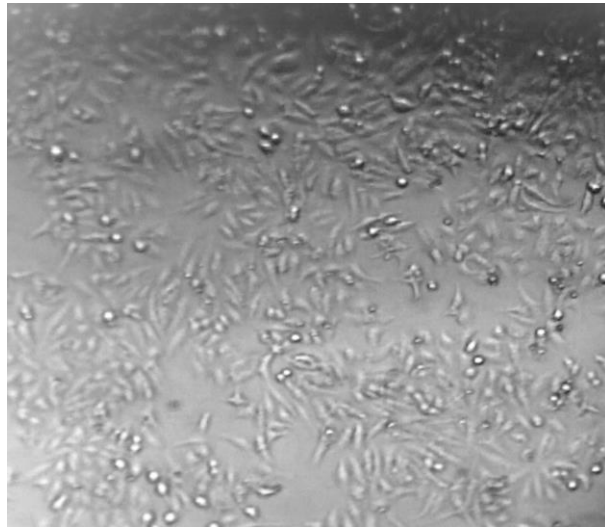


Figura 3 – Células HepG2 em cultivo em plena expansão. Aumento final: 200x.
Fonte: Arquivo pessoal.

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).

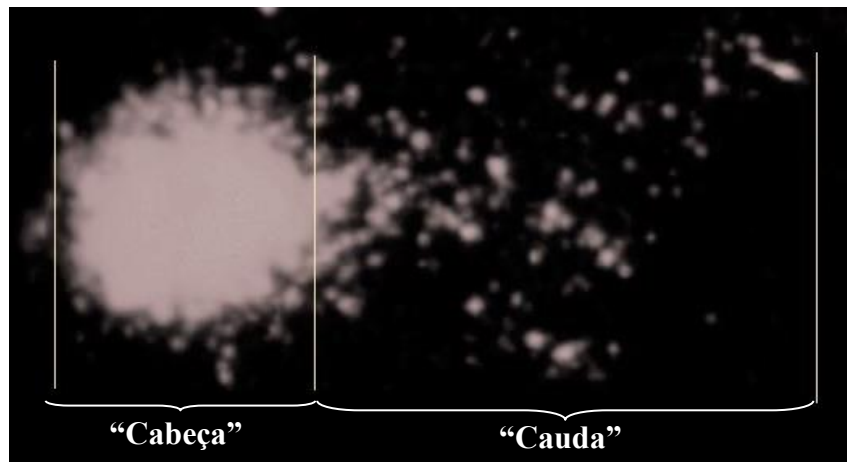


Figura 4 – Divisão do cometa em “cabeça” e “cauda”, para classificação dos danos no DNA, em célula mononuclear do sangue periférico humano. Aumento final: 400x.
Fonte: Arquivo pessoal.

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).

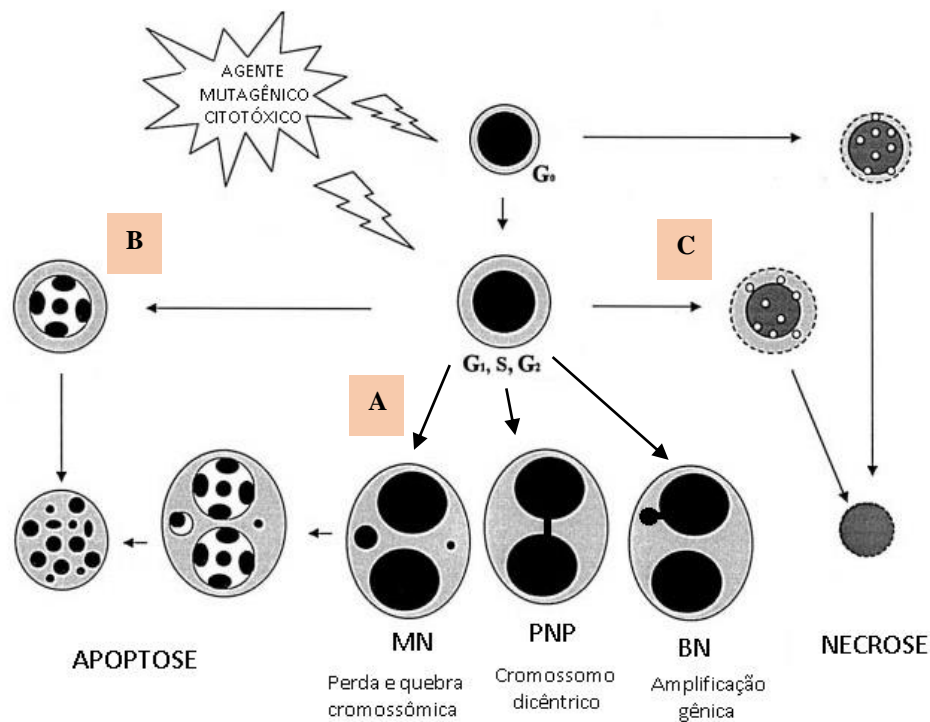


Figura 5 – Destinos possíveis de uma célula após contato com agente mutagênico e/ou citotóxico: A) Alterações genéticas, visíveis pelo teste do micronúcleo com o bloqueio da citocinese: MN – micronúcleo, caracterizado pela perda de um cromossomo inteiro ou fragmentos de cromossomos acêntricos; PNP – 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_1 , S e G_2 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_1 , S e G_2 do ciclo celular pela ação direta de um agente citotóxico.

Fonte: Modificado de Fenech (2000).

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: Alcançe, 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.