



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**BRUNO COELHO CAVALCANTI**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÁCIDO  
CAURENÓICO, UM DITERPENO ISOLADO DA PLANTA  
*Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE)**

**FORTALEZA**

**2006**

BRUNO COELHO CAVALCANTI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÁCIDO  
CAURENÓICO, UM DITERPENÓISOLADO DA PLANTA  
*Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia do Ó Pessoa

FORTALEZA

2006

C365a Cavalcanti, Bruno Coêlho

Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae)/ Bruno Coêlho Cavalcanti. 2006.

95 f. : il.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2006.

1. *Copaifera langsdorffii*. 2. Diterpenos. 2. Copaiva. 3. Fabaceae. 4. Genotoxicidade. I. Pessoa, Cláudia do Ó (Orient.). I. Título.

CDD 615.323322

BRUNO COELHO CAVALCANTI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO ÁCIDO  
CAURENÓICO, UM DITERPENÓISOLADO DA PLANTA  
*Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 14/12/06

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Rommel Rodríguez Burbano  
Universidade Federal do Pará-UFC

## AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo, amizade e paciência demonstrada em todos os momentos de trabalho em comum;

À Dr<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa Lotufo, por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa;

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e por sua contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

Ao Dr. Vietla Satyanarayana Rao, por sua contribuição a realização desse trabalho;

Ao Dr. Edilberto Rocha Silveira, pela colaboração neste trabalho e pela amizade;

Aos Dr. João Antônio Pêgas Henriques e a Dr<sup>a</sup>. Jenifer Saffi, por terem me recebido muito bem em seus Laboratórios na UFRGS e por terem me dado condições de fazer vários experimentos importantes para o desenvolvimento dessa dissertação;

Ao Dr. Rommel Rodríguez Burbano, por ter me recebido em seu Laboratório na UFPA de braços abertos, pelos ensinamentos em citogenética, pela colaboração à realização desse trabalho e pela amizade;

À Dr<sup>a</sup>. Maria Emília Ramos da Universidade Federal de Feira de Santana (Bahia), pela amizade e ensinamentos indispensáveis à realização desse trabalho;

Aos amigos e colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Genética Toxicológica e Câncer da UFPA (GENTOC): André Khayat, Eleônidas Lima, Igor Seligmann, Adriana Guimarães, Daniela Leite, Dani Calcagno e Patrícia Lima;

Aos amigos e colegas do GENOTOX/UFRGS: Renato Moreira Rosa, Dinara Jaqueline Moura, Miriana Machado, Jaqueline Silveira, Juliana da Silva.

Aos amigos e colegas do LOE: Aílton Teles, Alessandra de Paula, André Viana, Andrew Sá, Arenice Costa, Cecília Carvalho, Danilo Rocha, Delano, Eliane, Érika Lima, Fernanda Castro, Gardênia Militão, Hélio Nobre, Hildebrando Mota, Ivana Dantas, Jérсия, Kézia, Lidiane Arruda, Paulo Michel, Patrícia Bonavides, Patrícia Marçal, Washington Barros;

Aos amigos da velha guarda do LOE: Diego Wilke, Márcio Roberto, Marne Vasconcellos, Paula Jimenez, Raquel Montenegro e Sérgio Fortier pela amizade, apoio, confiança e pelo exemplo acadêmico a ser seguido;

À amiga Carla Sombra, por ter me ajudado em boa parte desse trabalho;

Aos amigos Daniel Bezerra, Hemerson Iury, Elthon Ferreira e Rômulo Feio pela amizade, apoio e colaborações intelectuais;

Aos técnicos do LOE: Silvana França, Luciana França e Adriano, pela amizade e imensurável ajuda cedida a este e a todos os outros trabalhos realizados no laboratório;

Aos professores dos Departamentos de Biologia, Bioquímica e Biologia Molecular e Fisiologia e Farmacologia da UFC, pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC: Íris, Fernando, Áurea e Chiquinho;

Ao amigo Carlos Henrique, pela importante contribuição na formatação desse trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho;

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo suporte financeiro indispensável à realização desse trabalho;

À Priscylla Tanara, minha Neguinha, pelo apoio, compreensão, companherismo, amor e carinho nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, Majela e Regina, pela vida, pela educação e formação moral que me transmitiram, pelo amparo nos momentos difíceis, pela eterna inspiração, devoção e felicidade que lhes contagia nos momentos em que estou feliz e por nunca me deixar abandonar os meus ideais;

Aos meus grandes e maravilhosos irmãos, Igor, Lívio e Diego, que sempre me apoiaram e torceram por mim, pelos anos de fraternidade e experiências compartilhadas;

Aos demais familiares pelo exemplo de união e solidariedade;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

**“É preciso viver, não apenas existir”  
(Plutarco)**

## RESUMO

O ácido caurenóico (AC) é um diterpeno presente no óleo resinoso de espécies de *Copaifera*. Assim como o óleo resinoso, o AC também apresenta uma ampla variabilidade de aplicações medicinais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do AC isolado da planta *Copaifera langsdorffii* em linfócitos, células leucêmicas HL60 e em células da medula óssea de camundongos. O AC não mostrou seletividade entre linfócitos e HL60 tendo induzido apoptose e danos ao DNA na mesma intensidade, avaliados pela coloração diferencial por brometo de etídio/acridina laranja e pelo teste do cometa, respectivamente. De acordo com o teste do cometa, mais de 80% dos danos induzidos ao DNA de linfócitos foi reparada 48 horas após o tratamento. Linfócitos tratados com AC apresentaram aumento, significativo, na frequência de micronúcleos e maior sensibilidade (citotoxicidade e aberrações cromossômicas) nas fases G<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>/S do ciclo celular, sem induzir aumento no número de células poliplóides. Camundongos foram tratados com AC nas doses de 25, 50 e 100mg/kg e após 24 e 48 horas sacrificados, sendo, posteriormente, extraída a medula óssea, e o material submetido às observações de perdas cromossômicas (micronúcleos) em eritrócitos policromáticos. Uma maior incidência de micronúcleos ocorreu no grupo de animais sacrificados 24 horas após o tratamento. A avaliação da razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, foi menor para os animais sacrificados 48 horas após o tratamento, indicando toxicidade em células da medula. Nos ensaios de mutagênese com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o efeito citotóxico e mutagênico do AC foi mais acentuado durante o crescimento exponencial da levedura, no qual o DNA está mais acessível ao composto. O AC induziu mutações lócus específicas e de deslocamento do quadro de leitura. Mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura tendem a serem induzidas por agentes intercalantes de DNA e têm sido correlacionadas com as quebras de fitas de cadeia de DNA induzidas pela inibição da ação de topoisomerase. No teste de relaxamento do DNA, o AC inibiu a ação da topoisomerase I. A inibição da ação da topoisomerase I parece estar relacionada à intercalação do AC no DNA. Assim, as quebras de fitas no DNA e indução de micronúcleos e mutações de deslocamento do quadro de leitura, podem estar relacionadas à ação intercalante do ácido caurenóico. A ausência de células poliplóides sugere que o ácido caurenóico não interfere no aparelho mitótico da célula. Em conclusão, o ácido caurenóico apresenta potencial genotóxico e mutagênico nos modelos estudados.

Palavras-chave: Diterpenos. Copaiva. Fabaceae . Genotoxicidade.



## ABSTRACT

Kaurenoic acid (KA) is a diterpene presents in the oil-resin (copaiba oil) from plants belongs to *Copaifera* spp. As copaiba oil, KA also displayed a great variability of medicinal applications. In the present study, the genotoxic and mutagenic potential of KA from *Copaifera langsdorffii* on human lymphocytes, human leukemia cells (HL60) and bone marrow cells was evaluated. KA did not show selective action between lymphocytes and leukemia cells, has been induced apoptosis and DNA damage at same magnitude as valuated by bromide etidium/orange acridine and comet assay. Due to this observation, lymphocytes were selected for further experiments. According with comet assay results, more than 80% of lymphocytes DNA damage was repaired after 48 hours post-treatment. Lymphocytes treated with KA (30 and 60µg/mL) showed increases on micronucleus frequencies in relation to negative control group. On the chromosome aberration test, lymphocytes treated at phse G<sub>1</sub> and transition phase G<sub>1</sub>/S showed great sensibility (cytotoxicity and chromosomes aberrations) in comparison to cells treated at another phases of cell cycle. After treatment, any increase of polyploidy cells number was noted. Mices were treated with KA (25, 50 and 100mg/kg), and after 24 and 48 hours, they were sacrificed afterwards with the medulla extraction. This material was submitted to chromosomal damage observations (micronuclei) in polychromatic erythrocytes (PCE). A great occurrence of micronucleated PCE was noted only at animals groups sacrificed 24 hours after treatment. The rate between PCE and NCE (normochromatic erythrocytes) was lower for animals sacrificed later. These observations indicating toxicity effects on the bone marrow cells. The mutagenic assay with yeast *Saccharomyces cereviseae* showed that the cytotoxic and mutagenic effects of KA were more pronounced during exponential growth phase, when the access to DNA is facilitated. KA induced locus and frameshift mutations. Frameshift mutations induced by DNA-intercalanting drugs have been correlated with DNA strand breaks induced by inhibition of DNA topoisomerases. On the DNA relaxation assay, KA inhibited the action of topoisomerase I. This inhibition effect seems to be related to the intercalanting ability of kaurenoic acid between DNA bases of pair. Thus, DNA strand breaks, the occurrence of micronucleated cells and frameshift mutations could be explained by the intercalanting action of kaurenoic acid. And the absence of polyploidy cells suggests that kaurenoic acid did not interfere on mitotic apparatus of cell. In conclusion, kaurenoic acid showed genotoxic and mutagenic effects on all the assays used.

**Keywords:** Diterpenes. Copaiva. Fabaceae. Genotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>COPAIFERA LANGSDORFFII</i> DESF. ....	20
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CAURENÓICO (ÁCIDO ENT-CAUR-16-EN-19-OICO).....	22
FIGURA 3 - MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM ERITROCITÁRIA.....	29
FIGURA 4 - ORIGEM DO MICRONÚCLEO A PARTIR DE UM FRAGMENTO CROMOSSÔMICO ACÊNTRICO E DE UM CROMOSSOMO INTEIRO EM UMA CÉLULA BINUCLEADA PELO USO DE CITOCALASINA B .....	29
FIGURA 5 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. CEREVISEAE</i> .....	34
FIGURA 6 - TIPOS DE COMETA. CLASSIFICAÇÃO POR CATEGORIA DE DANO: (0) SEM DANO (< 5%); (1) BAIXO NÍVEL DE DANO (5 - 20%); (2) MÉDIO NÍVEL DE DANO (20 - 40%); (3) ALTO NÍVEL DE DANO (40 – 95%); (4) DANO MÁXIMO (> 95%) .....	44
FIGURA 7 - ERITRÓCITO NORMOCROMÁTICO (A), ERITRÓCITO POLICROMÁTICO (B) E ERITRÓCITO POLICROMÁTICO MICRONUCLEADO (C).....	47
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DE LINFÓCITOS BINUCLEADOS PORTANDO MICRONÚCLEOS .....	49
FIGURA 9 - EFEITO DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE LINFÓCITOS HUMANOS E CÉLULAS LEUCÊMICAS HL60 APÓS 4 HORAS DE (A) E 24 HORAS (B) DE EXPOSIÇÃO DETERMINADA POR EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN. O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR A DROGA, DMSO (0,1%), FOI UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO E A DOXORRUBICINA (0,3µG/Ml) FOI UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA ± DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. *p<0,001; **p<0,01 E ***p<0,05 COMPARADO COM O CONTROLE NEGATIVO POR ANOVA SEGUIDO POR STUDENT NEWMAN KEULS .....	55
FIGURA 10 - EFEITO DO ÁCIDO CAURENÓICO EM LINFÓCITOS HUMANOS (A) E CÉLULAS LEUCÊMICAS HL60 (B) ANALISADOS PELA COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BROMETO DE ETÍDIO/ACRIDINA LARANJA APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO. O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR A DROGA, DMSO (0,1%), FOI UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO E A DOXORRUBICINA (0,3µG/Ml) FOI UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA ± DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. *p<0,001 E **p<0,01 COMPARADO COM O CONTROLE NEGATIVO POR ANOVA SEGUIDO POR STUDENT NEWMAN KEULS .....	56
FIGURA 11 - EFEITO DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE A AÇÃO DA ENZIMA TOPOISOMERASE I (TOPO I). A. 250 NG DE DNA SUPERCOMPACTADO FOI INCUBADO COM 4 UNIDADES DE TOPOISOMERASE I NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE ÁCIDO CAURENÓICO (10 E 30 µG/Ml). B. 500 NG DE DNA SUPERCOMPACTADO FOI INCUBADO COM 4 UNIDADES DE TOPOISOMERASE I NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE ÁCIDO CAURENÓICO (10 E 30 µG/Ml). O RELAXAMENTO DO DNA FOI ANALISADO APÓS ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1%. O GEL FOI CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO E REVELADO COM AUXÍLIO DE LUZ ULTRAVIOLETA .....	57
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DAS CLASSES DE COMETAS (0 – SEM DANOS A 4 – DANO MÁXIMO) EM LINFÓCITOS HUMANOS EXPOSTOS DURANTE 4 (A) E 24 HORAS (B) E CÉLULAS LEUCÊMICAS HL60 EXPOSTAS POR 4 (C) E 24 HORAS (D) AO ÁCIDO CAURENÓICO ANALISADOS PELO TESTE DO COMETA..	58

- FIGURA 13 - ÍNDICE DE DANO AO DNA DE LINFÓCITOS HUMANOS E CÉLULAS LEUCÊMICAS HL60 TRATADAS COM ÁCIDO CAURENÓICO DURANTE 4 (A) E 24 HORAS (B) DETERMINADO PELO TESTE DO COMETA. O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR A DROGA, DMSO (0,1%), FOI UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO E A DOXORRUBICINA (0,3 $\mu$ G/ML) FOI UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO. OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA  $\pm$  DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. \* $p < 0,001$  COMPARADO COM O CONTROLE NEGATIVO POR ANOVA SEGUIDO POR TUKEY.....59
- FIGURA 14 - REDUÇÃO DO ÍNDICE DE DANO AO DNA EM LINFÓCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 4 HORAS (TEMPO 0 H) COM ÁCIDO CAURENÓICO NAS CONCENTRAÇÕES DE 10 (A), 30 (B) E 60  $\mu$ G/ML (C) E RE-CULTIVADOS NA AUSÊNCIA DA DROGA (2 A 48H). OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA  $\pm$  DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  E \*\*\* $p < 0,001$  COMPARADO COM O CONTROLE (TEMPO 0H) POR ANOVA SEGUIDO POR TUKEY.....60
- FIGURA 15 - REDUÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DANO AO DNA EM LINFÓCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 4 HORAS (TEMPO 0 H) COM ÁCIDO CAURENÓICO NAS CONCENTRAÇÕES DE 10 (A), 30 (B) E 60  $\mu$ G/ML (C) E RE-CULTIVADOS NA AUSÊNCIA DA DROGA (2 A 48H). OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA  $\pm$  DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  E \*\*\* $p < 0,001$  COMPARADO COM O CONTROLE (TEMPO 0H) POR ANOVA SEGUIDO POR TUKEY.....60
- FIGURA 16 - EFEITO DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE A INCIDÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS HUMANOS. O VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR A DROGA, DMSO (0,1%), FOI UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO E O AGENTE ALQUILANTE METIL-METANO-SULFONADO (MMS) A  $4 \times 10^{-5}$  M FOI UTILIZADO COMO CONTROLE POSITIVO. OS DADOS CORRESPONDEM À MÉDIA  $\pm$  DP DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. \* $p < 0,01$  E \*\* $p < 0,001$  COMPARADO COM O CONTROLE NEGATIVO POR ANOVA SEGUIDO POR TUKEY.....62

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROTOCOLO DE TRATAMENTO DE LINFÓCITOS COM ÁCIDO CAURENÓICO NAS FASES DO CICLO CELULAR .....	50
TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE MICRÔNÚCLEOS EM ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS (EPC) DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO CAURENÓICO (AC) E A RELAÇÃO ENTRE EPC E ENC (ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS) EM DIFERENTES DOSES E TEMPOS PÓS-TRATAMENTO .....	61
TABELA 3 - EFEITO DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO E INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR DE LINFÓCITOS HUMANOS .....	63
TABELA 4 - REVERSÃO DA MUTAÇÃO PONTUAL PARA ( <i>HIS1-7</i> ), ALELO OCRE ( <i>LYS1-1</i> ) E MUTAÇÕES DO TIPO DESLOCAMENTO DO QUADRO DE LEITURA ( <i>HOM3-10</i> ) EM LINHAGEM HAPLÓIDE XV185-14C DE <i>S.CEREVISIAE</i> APÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO CAURENÓICO DURANTE 18 HORAS EM CONDIÇÕES DE NÃO CRESCIMENTO (PBS) .....	65
TABELA 5 - REVERSÃO DA MUTAÇÃO PONTUAL PARA ( <i>HIS1-7</i> ), ALELO OCRE ( <i>LYS1-1</i> ) E MUTAÇÕES DO TIPO DESLOCAMENTO DO QUADRO DE LEITURA ( <i>HOM3-10</i> ) EM LINHAGEM HAPLÓIDE XV185-14C DE <i>S.CEREVISIAE</i> APÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO CAURENÓICO EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	66

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
<	Menor que
AC	Ácido Caurenóico
ANOVA	Análise de Variância ( <i>Analysis of Variance</i> )
BE/AL	Brometo de Etídio/Acridina Laranja
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DL <sub>50</sub>	Dose efetiva média
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão da Média
EPC	Eritrócito Policromático
ENC	Eritrócito Normocromático
FD	Frequência de Dano
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
h	Horas
ID	Índice de Dano
IM	Índice Mitótico
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ng	Nanograma
MMS	Metil-metano-sulfonado
4-NQO	Óxido de Nitroquinolina
PBS	Tampão Fosfato ( <i>Phosphate Buffer Solution</i> )
pH	Potencial Hidrogênico
RNA	Ácido Ribonucléico
X	Vezes

## SUMÁRIO

<b>1.1 Produtos Naturais</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Toxicidade de plantas medicinais (<i>in natura</i> ou manufaturados)</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3 Gênero <i>Copaifera</i> L.</b> .....	<b>19</b>
1.3.1 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. ....	19
1.3.2 Importância farmacológica do óleo-resina de copaíba .....	20
1.3.3 Ácido Caurenóico: fitocomposto estudado de <i>C.langsdorffii</i> .....	21
<b>1.4 Genotoxicidade</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.1 Teste de avaliação de genotoxicidade</b> .....	<b>24</b>
1.4.1.1 Teste do Cometa .....	25
1.4.1.2 Teste do Micronúcleo <i>in vivo</i> .....	26
1.4.1.3 Teste do Micronúcleo <i>in vitro</i> .....	28
1.4.1.4 Aberrações Cromossômicas .....	29
1.4.1.5 Teste de Mutagenicidade .....	31
1.4.1.5.1 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo eucarioto.....	32
1.4.1.5.2 Mutagênese.....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>35</b>
• Determinar e comparar o potencial genotóxico <i>in vitro</i> do ácido caurenóico em linfócitos humanos e células tumorais leucêmicas (HL60) através do Teste do Cometa; .....	35
• Avaliar a cinética de reparo do dano ao DNA induzido pelo ácido caurenóico em linfócitos humanos através do Teste do Cometa;.....	35
• Determinar o potencial de indução de micronúcleos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> induzido pelo ácido caurenóico, em linfócitos humanos e células da medula óssea de camundongos, respectivamente; .....	35
• Estimar a indução de aberrações cromossômicas induzidas pelo ácido caurenóico sobre linfócitos humanos;.....	35
• Avaliar o potencial mutagênico do ácido caurenóico em modelo de mutagênese em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .....	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Materiais Utilizados</b> .....	<b>36</b>
3.1.1 Equipamentos .....	36
3.1.2 Soluções e Reagentes .....	36
<b>3.2 Isolamento do Ácido Caurenóico</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3 Linhagens Celulares</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Isolamento dos Linfócitos .....	38
3.3.2 Manutenção e Cultivo da Linhagem Celular Tumoral HL60 .....	38
<b>3.4 Estudo de Mecanismos de Ação</b> .....	<b>39</b>

3.4.1	Viabilidade Celular – Exclusão pro Azul de Tripán .....	39
3.4.1.1	Análise estatística.....	39
3.4.2	Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja .....	39
3.4.2.1	Análise Estatística.....	40
3.4.3	Avaliação da Inibição da Atividade da Enzima Topoisomerase I pelo Método de Relaxamento do DNA	41
<b>3.5</b>	<b>Teste do Cometa .....</b>	<b>41</b>
3.5.1	Seleção de Voluntários e Obtenção do Material para Análise.....	41
3.5.2	Tratamentos .....	42
3.5.2.1	Avaliação Comparativa do Potencial Genotóxico sobre Linfócitos e HL60 .....	42
3.5.2.2	Reparo do DNA em Linfócitos .....	42
3.5.3	Execução do Teste do Cometa.....	42
3.5.4	Análise Estatística .....	44
<b>3.6</b>	<b>Teste do Micronúcleo <i>in vivo</i> .....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Animais e Ambiente de Experimentação.....	44
3.6.2	Grupos amostrais .....	45
3.6.3	Obtenção e Preparação do Material para Análise .....	46
3.6.4	Análise de Micronúcleo.....	47
3.6.5	Análise Estatística .....	47
<b>3.7</b>	<b>Teste do Micronúcleo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
3.7.1	Tratamento.....	48
3.7.2	Fixação das Células .....	48
3.7.3	Preparação das Lâminas .....	48
3.7.4	Análise de Micronúcleo.....	49
3.7.5	Análise Estatística .....	49
<b>3.8</b>	<b>Aberrações Cromossômicas.....</b>	<b>49</b>
3.8.1	Tratamentos .....	50
3.8.2	Preparação das Lâminas .....	50
3.8.3	Análise Citogenética.....	51
3.8.3.1	Critérios de análise.....	51
3.8.4	Análise Estatística .....	51
<b>3.9</b>	<b>Teste de Mutagenicidade em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>51</b>
3.9.1	Linhagem e Meios de Cultura .....	51
3.9.2	Condições de Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .....	52
3.9.3	Teste de Sobrevivência.....	52
3.9.4	Detecção da Atividade Mutagênica induzida pelo Ácido Caurenóico.....	53
3.9.5	Análise Estatística .....	54
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>VIABILIDADE CELULAR – EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPÁN .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja ....</b>	<b>56</b>

<b>4.3</b>	<b>Efeito do Ácido Caurenóico Sobre a Enzima Topoisomerase I .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação do Teste do Cometa.....</b>	<b>57</b>
4.4.1	Avaliação Comparativa do Potencial Genotóxico do Ácido Caurenóico sobre Linfócitos Humanos e HL60 .....	58
4.4.2	Reparo do DNA .....	59
<b>4.5</b>	<b>Análise de Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongo .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise de Micronúcleo em Linfócitos Humanos.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7</b>	<b>Aberrações Cromossômicas .....</b>	<b>62</b>
<b>4.8</b>	<b>Atividade Mutagênica do Ácido Caurenóico em <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>63</b>
4.8.1	Efeito Citotóxico .....	63
4.8.2	Efeito Mutagênico .....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (BALUNAS; KINGHORN, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80 % da população mundial depende da medicina tradicional para suprir as necessidades de assistência médica primária (FARNSWORTH, 1985; CRAGG; NEWMAN, 2000; FONSECA; PEREIRA, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2005). Sendo que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas *in natura* ou produtos manufaturados a partir de seus extratos ou princípios ativos (MORAES *et al.*, 2003). Segundo Shu (1998), das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente originadas de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais.

Sabe-se que 61% das 877 moléculas introduzidas na terapêutica entre os anos 1981 – 2002 foram inspiradas em produtos naturais, sendo que 6% delas são empregadas diretamente como a substância original, 27% foram derivados de produtos naturais, 5% são compostos sintéticos com farmacóforos derivados de produtos naturais e 23% são sintéticos obtidos do desenho estrutural originado de um produto natural. Esses dados mostram que os produtos naturais têm grande valor intrínseco decorrente da sua atividade biológica, o que vem estimulando as companhias farmacêuticas (CRAGG *et al.*, 2003; OLIVEIRA; BRAGA, 2003).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajudam a reduzir a importação de drogas, e ainda incrementa o desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998). Além disso, medicamentos derivados de plantas conhecidas tendem a ser mais aceitos pela população, facilitando a aderência ao tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Não há dúvidas de que as plantas medicinais são importantes em países em desenvolvimento como opção para a prescrição na terapêutica medicamentosa (WHO, 1998). De acordo com Calixto (2000), o número de plantas nativas do Brasil usadas *in natura* ou manufaturadas como fitomedicamentos já ultrapassa uma centena.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. Apesar de sua rica flora, que representa mais de 20 % das espécies de plantas conhecidas no mundo (TOMLINSON; AKERELE, 1993; KATO, 2001), uma vasta quantidade de espécies vegetais brasileiras permanece sem nenhum tipo de estudo químico e/ou biológico (CORDELL, 1995). Muito pouco tem sido feito no Brasil para estudar o seu potencial como fonte de novas bases medicamentosas ou mesmo como fitoterápicos (FERREIRA, 1998).

## **1.2 Toxicidade de plantas medicinais (*in natura* ou manufaturados)**

O uso de produtos naturais com fins terapêuticos aumentou consideravelmente na sociedade contemporânea. Uma parcela significativa da sociedade faz uso dos produtos naturais por achar que são seguros e promovem saúde, ao contrário dos produtos sintéticos, frequentemente associados com efeitos colaterais indesejados (YUNES *et al.*, 2001; CHAN, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006).

Em algumas áreas, especialmente de países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças (COSTA *et al.*, 1997; MATOS *et al.*, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Diferentemente do que ocorre nos Estados Unidos e na Europa, onde se há mais controle no registro e na comercialização dos produtos obtidos de plantas, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA- JÚNIOR *et al.*, 2005).

Apesar da importância das plantas medicinais, pouco se conhece acerca dos efeitos biológicos da grande maioria dessas espécies de plantas (BAROOS *et al.*, 2003; CHOI; CHUNG, 2003; DE MIRANDA *et al.*, 2004). Poucos produtos (*in natura* ou manufaturados) foram suficientemente estudados do ponto de vista clínico e toxicológico, de forma a confirmar a sua eficácia e segurança, como exigido para os demais medicamentos (PETROVICK, 1997). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação de medicamentos fitoterápicos, desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança desses

medicamentos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Entretanto, essa resolução não vem sendo obedecida por grande parte da indústria nacional de fitomedicamentos, que continua a comercializá-los sem garantias da sua eficácia e segurança (YUNES *et al.*, 2001; LOSOVOI, 2002).

Os testes para avaliação de toxicidade das substâncias químicas estão bem detalhados segundo os protocolos sugeridos pela OECD (1996). No Brasil, a Resolução – RE n. 90, publicada em 16 de março de 2004, apresenta um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Esta resolução foi elaborada em conformidade com as normas da Organização Mundial de Saúde (OMS), e recomenda estudos de toxicidade aguda, de doses repetidas e quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos, estudos de genotoxicidade (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de Saúde Pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis de adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. Diversos fitoterápicos usados no Brasil têm sido documentados como sendo seguros e eficazes, baseados apenas em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, realizados em animais. No entanto, esses estudos não garantem evidências suficientes para assegurar a sua eficácia e segurança em seres humanos (PIMENTEL *et al.*, 1998). Pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos fiscais (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Como exemplo de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas, pode ser citado os efeitos hepatotóxicos do apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO *et al.*, 2000). Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial, assim como, diversas substâncias isoladas de plantas medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

A predição acurada da toxicidade de drogas (naturais ou sintéticas) em humanos requer, não somente a análise da relação dose-resposta, mas, também o claro conhecimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos fatores de risco correspondentes (LI, 2004).

### 1.3 Gênero *Copaifera* L.

O gênero *Copaifera* L. pertence à família Leguminosae (subfamília: Caesalpinoideae). São árvores de grande porte e crescimento lento, chegando a alcançar uma altura de 25 a 40 metros, com troncos de 50 a 80 centímetros de diâmetro e folhas compostas alternadas com três pares de folíolos de forma oval alargada (LIMA *et al.*, 1995; PINTO; VEIGA, 1998; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Seus frutos são deiscentes, ovóides, com uma única semente e cobertas com um arilo amarelo (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Estas árvores encontram-se distribuídas na África e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (WILLIS, 1973), principalmente no Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia (LIMA, 1995). Suas espécies são popularmente conhecidas como: copaíba, pau d'óleo, podói, cupaúba e cupiúva (PIO CORRÊA, 1984).

O gênero *Copaifera* possui 72 espécies (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002) e, de acordo com os levantamentos realizados por Rizzini (1963), Braga (1976) e Pio Corrêa (1984), o gênero *Copaifera*, no Brasil, é representado por 17 espécies, dentre as quais, as espécies *C. cearensis*, *C. langsdorffii*, *C. luetzelburgii* e *C. coriaceae* podem ser encontradas no Estado do Ceará.

#### 1.3.1 *Copaifera langsdorffii* Desf.

A *Copaifera langsdorffii* Desf. (Figura 1) é uma espécie arbórea de grande porte, podendo alcançar até 35 metros de altura. Suas folhas são alternas e compostas, cheias de glândulas contendo óleo resinoso. Possui uma grande plasticidade ecológica (capacidade de adaptação a diferentes ambientes). Apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul, principalmente na Argentina, Bolívia e Brasil. Sua distribuição no Brasil é relatada principalmente nos Estados do Ceará, Distrito Federal,

Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Tocantins (ALMEIDA *et al.*, 1998), além da Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia) (SEBRAE, 1998).



Figura 1 - *Copaifera langsdorffii* Desf.

### 1.3.2 Importância farmacológica do óleo-resina de copaíba

Dentre as várias utilidades da copaíba destaca-se seu uso madeireiro, medicinal, cosmético e industrial (CARVALHO, 1994). Sua utilização madeireira ocorre em função de características como superfície lisa e lustrosa, textura média e uniforme, durável e de alta resistência a ataque de xilófagos, e apresenta baixa permeabilidade, sendo por isso, largamente utilizada na construção civil e naval (CARVALHO, 1994).

Porém, atualmente, seu uso está mais voltado para a área medicinal devido ao óleo-resina extraído do caule de Copaíba que tem sido utilizado *in natura* como anti-reumático, anti-tetânico, contra doenças pulmonares e urinárias, dentre outras aplicações (BRAGA, 1953; PIO CORRÊA, 1984; Del NUNZIO, 1995; ALMEIDA *et al.*, 1998; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

O óleo-resina extraído da copaíba é uma mistura natural de diterpenos ácidos em óleo essencial, composto, principalmente de sesquiterpenos (MAÍSTRO *et al.*, 2005). Estudos fitoquímicos com o óleo-resina, mostraram a presença de óleos essenciais (8%;  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\beta$ -elemano,  $\alpha$ -*cis*-bergamoteno, ar-curcumeno e  $\alpha$ -*trans*-bergamoteno) e uma mistura de diterpenos (70%; caur-16-en-19-oico e ácidos poliálticos) (GRAMOSA *et al.*, 1996). Estudos farmacológicos têm demonstrado que o óleo-resina de copaíba possui atividade antiinflamatória, gastroprotetora e cicatrizante (FERNANDES *et al.*, 1992; PAIVA *et al.*, 1998, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005),

bactericida (MARUZZELLA; SICURELLA, 1960; OPDYKE, 1976; CASCON *et al.*, 2000; TINCUSI *et al.*, 2002), anti-helmíntica (PELLEGRINO, 1967; GILBERT *et al.*, 1972), analgésica (FERNANDES; PEREIRA, 1989), tripanocida (CASCON *et al.*, 1998), efeito protetor contra colite aguda (PAIVA *et al.*, 2004) e antitumoral (OHSAKI *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 1998, 2003).

Atualmente existe forte interesse em caracterizar o potencial genotóxico dos extratos vegetais utilizados na saúde humana, uma vez que a maioria desses extratos possuem substâncias genotóxicas. Essas, podem atuar como agentes mutagênicos e carcinogênicos naturais (PANIGRAHI; RAO, 1982; ARAÚJO *et al.*, 1999; BURIM *et al.*, 1999) ou como agente anti-mutagênicos (CHACON *et al.*, 2002). Desmarchelier (1998) reportou que o extrato metanólico de *Copaifera reticulata* possui elevado potencial antioxidativo *in vitro* em baixas concentrações ( $CI_{50} = 3\mu\text{g/mL}$ ). Por outro lado, a avaliação do potencial mutagênico do óleo-resina de copaíba em diferentes espécies de roedores tem mostrado que, apesar das diferenças qualitativas entre os óleo-resinas estudados, o padrão de toxicidade é similar em relação aos efeitos citotóxicos e genotóxicos, ocorrendo, somente, em altas doses (MAÍSTRO *et al.*, 2005).

Nesse contexto devemos ressaltar a importância de estabelecer uma relação entre a composição química e atividades biológicas dos óleo-resinas de copaíba, a fim de validar a segurança e o efeito medicinal do óleo-resina extraído das espécies de *Copaifera*.

### 1.3.3 Ácido Caurenóico: fitocomposto estudado de *C. langsdorffii*

Os diterpenos caurânicos são precursores biossintéticos de várias substâncias do metabolismo de fungos e plantas, incluindo hormônios de crescimento vegetal (gibberalinas). Assim, diterpenos dessa classe apresentam ampla distribuição no reino vegetal, sendo normalmente encontrados em baixas concentrações. Alguns gêneros, no entanto, destacam-se pelos elevados teores de diterpenos caurânicos, como *Copaifera*, *Xylopi*a, *Annona* e *Mikania* spp. (OLIVEIRA; BRAGA, 2003).

Diversas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* já foram relatadas para diterpenos caurânicos, incluindo as atividades antimicrobiana, antiparasitária, inibidora do apetite de insetos, citotóxica, anti-HIV, antifertilizante, hipotensora e

antiinflamatória, além de atividade sobre a gênese de esteróides e a regulação do crescimento de plantas (GHISALBERT, 1997).

O ácido caurenóico (Figura 2) é um dos vários diterpenos encontrados no óleo de copaíba. Diversos estudos têm demonstrado seu amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, a atividade *in vitro* anti-parasítica e anti-microbiana, vasodilatadora e antiinflamatória (BOAKYE-YIDOM *et al.*; 1977, DAVINO *et al.*; 1989; BATISTA *et al.*; 1999, De MELO *et al.*; 2001; PAIVA *et al.*, 2003; TIRAPELLI *et al.*, 2004). Campos-Bedolla *et al.* (1997) descreveu a ação inibitória, do ácido caurenóico, sobre as contrações uterinas induzidas por serotonina, acetilcolina e oxitocina. Costa-Lotufo *et al.* (2002) demonstrou a ação anti-proliferativa contra células tumorais, efeito hemolítico em eritrócitos humanos e murinos, e embriotoxicidade em embriões de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*).

A abundância em diterpenos caurânicos, e as diversas atividades relatadas para esses compostos, leva à concluir que substâncias dessa classe podem constituir protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, diversos trabalhos foram realizados no Brasil visando o estudo fitoquímico e farmacológico de diterpenos caurânicos, o que permitiu, em alguns casos, estabelecer relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (MONTI *et al.*, 1996; GHISALBERT, 1997; VIEIRA *et al.*, 2002).

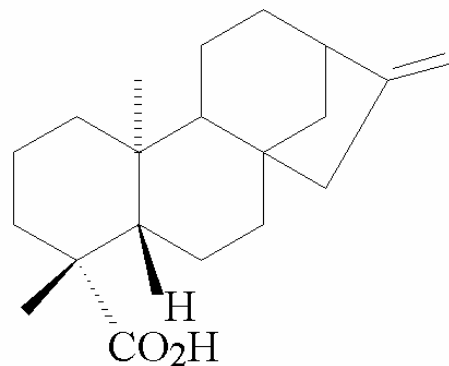


Figura 2 - Estrutura química do ácido caurenóico (ácido ent-caur-16-en-19-oico)

#### 1.4 Genotoxicidade

DNA das nossas células sofre, diariamente, mais de dez mil lesões, em parte, devido ao próprio metabolismo celular e/ou erros durante a replicação do material genético. Contudo, a exposição a agentes químicos, físicos e biológicos contribui para

incrementar a carga mutagênica a qual os seres humanos são expostos, a cada dia (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). As pessoas são continuamente expostas a vários agentes químicos que têm mostrado propriedades carcinogênicas ou mutagênicas em sistemas experimentais (WOGAN *et al.*, 2004; JEFFREY; WILLIAMS, 2005). O efeito genotóxico de um agente potencialmente mutagênico, depende do seu alvo celular. Alguns compostos químicos precisam ser metabolizados antes de adquirirem sua capacidade mutagênica (pró-mutágenos). Os agentes mutagênicos podem induzir mudanças genômicas por interagir diretamente ou indiretamente com o DNA ou por interagir com proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003; HOUTGRAAFF *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos sobre genotoxicidade e mutagenicidade tem sido realizada sobre produtos químicos industriais, farmacêuticos e contaminantes ambientais (SNYDER; GREEN, 2001; WOGAN *et al.*, 2004; AYDEMIR *et al.*, 2005; NG *et al.*, 2006; MORALES-RAMÍRES *et al.*, 2006; BRAMBILLA; MARTELLI, 2006). Estudos genotoxicológicos de substâncias químicas presentes na dieta alimentar (aditivos e contaminantes) são cada vez mais comuns (JEFFREY; WILLIAMS, 2005). No entanto, há pouca informação sobre a genotoxicidade de drogas vegetais (LOHMAN *et al.*, 2001).

Muitas plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores (FONSECA; PEREIRA, 2004). Alguns metabólitos secundários provenientes de plantas possuem propriedades antioxidantes, que podem prevenir o material genético contra danos de natureza oxidativa (ZHANG *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2007). Porém, muitos xenobiontes derivados de plantas medicinais são capazes de induzir modificações químicas no DNA, as quais podem ser nocivas às células, pois interferem em processos vitais, como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, bem como podem agredir a estrutura do DNA promovendo lesões gênicas e cromossômicas (TRAORE *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2003; VERSCHAEVE *et al.*, 2004). Para alguns desses compostos químicos já foram detectadas propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas (VARGAS *et al.*, 1990; VARANDA *et al.*, 1997), muitas dessas plantas são, constantemente, correlacionadas com a alta frequência de doenças e tumores (MOREIRA *et al.*, 2002). Alguns pesquisadores têm reportado, recentemente, o potencial genotóxico e mutagênico de extratos vegetais de plantas medicinais (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005; STEENKAMP *et al.*, 2005), como, *Phyllanthus*



*orbicularis* (SÁNCHEZ-LAMAR *et al.*, 2002), *Chrysobalanus icaco* L. (FERREIRA-MACHADO *et al.*, 2004) e *Aloe vera* (PAES-LEME *et al.*, 2005). Contudo, a avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de compostos provenientes de plantas é fundamental para a redução dos riscos de exposição a esses agentes.

#### 1.4.1 Teste de avaliação de genotoxicidade

A detecção de danos ocorridos no material genético pode ser feita por vários métodos, dentre estes, os citogenéticos são amplamente utilizados. Geralmente usando células obtidas de animais ou linfócitos periféricos de indivíduos envolvidos. Os linfócitos são indicadores sensíveis aos agentes genotóxicos, pois há correlação entre os danos induzidos nas células do sangue e outras células somáticas, servindo de eficiente modelo para pesquisas de genotoxicidade, além de apresentarem uma vida relativamente longa, circulam por todos os tecidos, e ainda, são facilmente obtidos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Em geral, para compostos com limitada ou nenhuma exposição para humanos, são usados pelo menos dois testes de curta-duração *in vitro*. Um medindo a habilidade da substância em induzir mutações ao nível de genes em células bacterianas e outro ao nível de cromossomos em células de mamíferos. No caso de substâncias em que se espera exposição humana extensa e/ou direta (ex.: aditivos alimentares e fármacos), muitas estratégias de teste têm sido propostas através dos anos, indicando três ou quatro testes ao nível de genes e cromossomos. Incluindo muitas vezes um teste *in vivo* em roedores. Devido à variedade de potenciais lesões moleculares relevantes ao desenvolvimento do câncer e de defeitos genéticos transmissíveis, a análise de múltiplos efeitos genéticos é geralmente necessária no *screening* em genotoxicidade de substâncias. Desse modo, essas substâncias devem ser testadas em vários ensaios a fim de se obter informações suficientes sobre o potencial genotóxico de cada uma (EISENBRAND *et al.*, 2002).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON; VOGELSTEIN, 1990), havendo alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade – tanto em roedores como no homem

(McCANN *et al.*, 1975, PURCHASE *et al.*, 1978). Como resultados dessas considerações, os testes genotóxicos são utilizados, rotineiramente, para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos.

Um número de testes de curta-duração está disponível para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são frequentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de proto-oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade.

Não existem dúvidas de que os testes de genotoxicidade devam fazer parte de um sistema de avaliação de todos os novos agentes químicos. Ficando o sistema teste apropriado, bem como o modelo do protocolo, à serem determinados, frequentemente, pelas diretrizes regulatórias internacionais: *International Conference on Harmonization* (ICH), e da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). E no Brasil ficando sobre a responsabilidade regulatória da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

#### 1.4.1.1 Teste do Cometa

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, por Olive (1989), o teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* (SCGE), tem sido, rotineiramente, utilizado na avaliação genotoxicológica de compostos químicos industriais, biocidas, agroquímicos e produtos farmacêuticos (HARTMANN *et al.*, 2003).

Durante os últimos dez anos, tornou-se um dos principais métodos no estudo de lesões no DNA. Com aplicações em testes de genotoxicidade, epidemiologia molecular, ecotoxicologia e biomonitoramento populacional. (COLLINS, 2004; FAUST *et al.*, 2004). O teste do cometa em comparação a outras metodologias empregadas na toxicologia genética, apresenta muitas vantagens como, por exemplo, a simplicidade, o baixo custo econômico e a rapidez de execução. Assim como a alta sensibilidade na detecção de lesões específicas (quebras de fita simples e duplas). Algumas variações foram introduzidas no ensaio, como a utilização de enzimas digestivas específicas que

permitem que mutações, incorporações erradas de uracila no DNA, danos nas bases (pirimidinas oxidadas), sítios de reparo, ligações cruzadas (DNA-DNA ou DNA-proteína) sejam transformados em quebras e possam, então, ser analisados pelo teste (PFUHLER; WOLF, 1996; COLLINS *et al.*, 1997a; DUTHIE; McMILLAN, 1997).

A versatilidade do método permitiu, ainda, que fossem feitas associações com procedimentos de hibridização *in situ* (FISH) de seqüências específicas de DNA dentro dos cometas (SANTOS *et al.*, 1997; McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1998; TICE *et al.*, 2000).

O teste do cometa, ainda, pode ser utilizado em estudos *in vivo* quando se deseja estudar o efeito genotóxico de uma dada substância em um órgão específico (SASAKI *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2004; BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005).

O princípio do teste está baseado na capacidade do DNA sofrer migração em uma matriz de agarose durante uma eletroforese. A detecção de migrações alteradas de DNA depende de vários parâmetros como, por exemplo, a concentração da agarose no gel, do pH, da temperatura, da voltagem e amperagem e da duração da eletroforese (HARTMANN *et al.*, 2003).

O teste do cometa não é utilizado para detectar mutações gênicas, mas, sim, lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio são passíveis de reparo. Assim sendo, o teste do cometa pode ser empregado em estudos de cinética de reparo de lesões no DNA. Porém, o teste não permite a identificação fidedigna do processo envolvido no reparo da lesão (RIBEIRO *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.2 Teste do Micronúcleo *in vivo*

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram atualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). É um teste rápido e eficaz na detecção de danos cromossômicos induzidos por agentes clastogênicos, que induzem quebras cromossômicas ou por agentes aneugênicos, que interferem na formação do fuso mitótico (SCHMID, 1975).

A utilização da análise de micronúcleos em células da medula óssea de roedores teve início a partir de estudos pioneiros realizados na década de 1970 (MATTER; SCHIMID, 1971; HEDDLE, 1973; SCHIMID, 1973, 1975). O objetivo desses estudos era identificar parâmetros que poderiam servir como indicadores de danos citogenéticos em células de medula óssea *in vivo*. Desses estudos, os autores concluíram que a incidência de eritrócitos policromáticos (EPC) micronucleados é particularmente útil como índice de dano citogenético na medula óssea dos roedores (HEDDLE *et al.*, 1983; GIMMLER-LUZ *et al.*, 1997).

Micronúcleos são estruturas cromatídicas delimitada por membrana, separados do núcleo principal e visíveis em células interfásicas. Podem ser resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal devido à ação de substâncias clastogênicas ou aneugênicas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo com eritrócitos se baseia no fato de que durante o processo de maturação dos eritroblastos, que resulta na formação dos eritrócitos, o núcleo é expulso da célula, de modo que, na ausência de eventos clastogênicos ou aneugênicos, nenhum material cromatídico está presente. Ao contrário do núcleo principal, micronúcleos não são expulsos durante o processo de maturação dos eritroblastos e, assim, na presença de agentes que induzam danos cromossômicos, sua presença pode ser detectada e computada em eritrócitos jovens, onde são facilmente reconhecidos. Os micronúcleos são tipicamente arredondados, medindo de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (SCHIMID, 1976; HEDDLE *et al.*, 1983; RABELLO-GAY, 1991).

Os micronúcleos são analisados em eritrócitos policromáticos (EPC), que são eritrócitos em estágio intermediário de desenvolvimento que ainda contém RNA e, portanto, podem ser distinguidos dos eritrócitos normocromáticos (ENC) – eritrócitos maduros que não apresentam RNA - pela coloração seletiva para RNA (Figura 3). A análise da proporção de EPC e ENC é importante na detecção de toxicidade excessiva na medula óssea. Geralmente, essa toxicidade é dada por uma depressão na porcentagem de EPC. Vale ressaltar que o tempo de vida do EPC é relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deva ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (RABELLO-GAY, 1991; RIBEIRO *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.3 Teste do Micronúcleo *in vitro*

Nas últimas décadas foi verificada a contribuição da aneuploidia para o desenvolvimento de tumores, adicionalmente ao que já é conhecido sobre o papel das aneuploidias em grande parte dos casos de abortos espontâneos. Em virtude disso, torna-se importante o desenvolvimento de ensaios biológicos que permitam a detecção de agentes aneugênicos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002) e clastogênicos.

O micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de danos cromossômicos ou dano no aparelho mitótico. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo celular. Por isso, os danos no DNA causados pela exposição de agentes mutagênicos, por exemplo, somente serão expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Consequentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997; CLARE *et al.*, 2006).

Diante desse fato, Fenech e Morley (1985a) modificaram a metodologia do ensaio empregando a citocalasina B. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da actina requerida para a citocinese (CARTER, 1967). O uso da citocalasina B induz o bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção das células em divisão (FENECH, 2000) (Figura 4).

O teste do micronúcleo com o emprego da citocalasina B pode ser utilizado para monitoramento genotóxico de populações, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como a variação interindividual da radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores (SHIBAMOTO *et al.*, 1991; BURRIL *et al.*, 2000; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

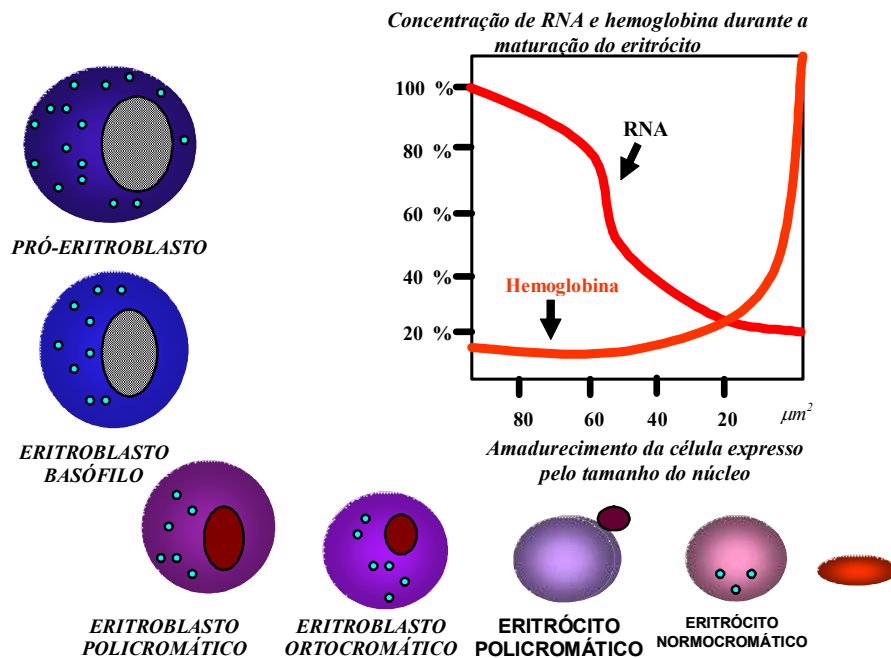


Figura 3 - Maturação das células da linhagem eritrocitária.

Fonte: Ribeiro *et al.* (2003)

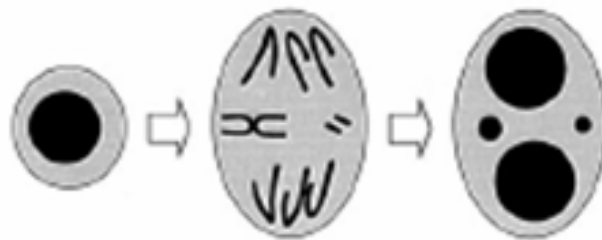


Figura 4 - Origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico e de um cromossomo inteiro em uma célula binucleada pelo uso de citocalasina B

Fonte: Fenech (2000)

#### 1.4.1.4 Aberrações Cromossômicas

Uma grande variedade de ensaios citogenéticos tem sido usada com sucesso no monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos. E as aberrações cromossômicas têm sido de grande importância, por avaliarem a possibilidade da ocorrência de câncer na população (AU *et al.*, 2001). O teste de aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos é um dos métodos mais sensíveis

para a detecção de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, sendo complementar ao teste de Ames em *Salmonella* (RIBEIRO *et al.*, 2003).

As aberrações cromossômicas representam a parte visível de um grande espectro de alterações no DNA, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparação das quebras nas cadeias do DNA (OBE *et al.*, 2002). As quebras nas cadeias dupla do DNA são as lesões primárias fundamentais para a formação de aberrações cromossômicas, podendo ser induzidas ou podem ocorrer espontaneamente, sendo que os mecanismos de reparo dessas lesões em células eucarióticas envolvem uma variedade de tipos de mecanismos, levando na maioria das vezes, à reunião não homóloga do DNA lesado, causando aberrações cromossômicas (PFEIFFER *et al.*, 2000). As quais estão intimamente relacionadas às doenças como neoplasias, na qual se verifica uma correlação positiva entre a frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos e o desenvolvimento do câncer (NATARAJAN, 2002).

As aberrações cromossômicas dividem-se em numéricas e estruturais. As numéricas são habitualmente classificadas em duas categorias: as euploidias (múltiplos de monoplóides) e as aneuploidias (perda ou ganho de um ou poucos cromossomos). Essas anomalias numéricas resultam, essencialmente, da interferência do agente mutagênico sobre o aparelho mitótico ou meiótico. As aberrações estruturais podem ser divididas em dois grupos principais: as cromossômicas (as duas cromátides-irmãs são quebradas) e as cromatídicas (uma das duas cromátides irmãs é quebrada).

As substâncias químicas, em sua ação sobre o DNA, podem ser divididas em duas classes: as que produzem aberrações em todas as fases do ciclo celular (S-independentes), e as que dependem da síntese de DNA para manifestar seu efeito (S-dependentes). As S-independentes como o antineoplásico bleomicina induzem, tal como a radiação ionizante, quebras nas duas cadeias do DNA produzindo aberrações cromossômicas em  $G_1$ , cromatídicas em  $G_2$  e uma mistura dos dois tipos em S. As S-dependentes (por exemplo, agentes alquilantes) produzem, tal como a luz ultra-violeta, seu efeito na fase S ou quando as células passam por uma fase de síntese entre a exposição e a observação do efeito. Nesse caso, as aberrações cromossômicas surgem devido a erros na duplicação do DNA. As aberrações induzidas em  $G_1$  e S (observadas na mitose subsequente) bem como em  $G_2$  (observadas na segunda mitose após a exposição), são do tipo cromatídico (NATARAJAN; OBE, 1980, 1986).

Nos ensaios de citogenética, os linfócitos do sangue periférico de mamíferos é um ótimo sistema para se testar uma substância quanto a sua capacidade em produzir

aberrações cromossômicas (NATARAJAN; OBE, 1980). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, os linfócitos serviriam como um sistema sentinela para grupos de alto risco (NORDENSON *et al.*, 1984).

#### 1.4.1.5 Teste de Mutagenicidade

Mutações são definidas como alterações no material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação genética. As mutações podem ocorrer devido a processos espontâneos ou podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Mutações em células somáticas estão muito bem correlacionadas com processos carcinogênicos, enquanto mutações que acometem células da linhagem germinativa estão correlacionadas com doenças hereditárias.

Os testes de mutagenicidade têm-se mostrado muito adequado na triagem rotineira de produtos químicos e são considerados parte essencial dos testes toxicológicos a serem realizados em amostras onde se deseja conhecer a sua atividade mutagênica (NATARAJAN; OBE, 1986).

Vários ensaios para identificação de agentes mutagênicos vêm sendo desenvolvidos (MacGREGOR *et al.*, 2000). As mutações são detectadas frequentemente através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas através de análises citogenéticas (FRIEDBERG *et al.*, 1995).

Bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* são utilizadas nos métodos mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas (AMES *et al.*, 1973; MARON; AMES, 1983; GEE *et al.*, 1994; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO *et al.*, 2001). Mas, como estas bactérias são organismos simples (procariontes), os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais e outros eucariontes. Portanto, para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos existem testes de mutagenicidade em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em



*Drosophila melanogaster* ou mesmo mutações somáticas em células de mamíferos, pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos) (MacGREGOR *et al.*, 2000).

#### 1.4.1.5.1 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo eucarioto

A *S.cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isso significa que ela fermenta hexoses, como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono de *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecida como repressão da glicose ou repressão catabólica. Quando a concentração de glicose é muito baixa no meio, há a desrepressão das enzimas mitocondriais e de genes necessários para o crescimento respiratório (De WINDE *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998).

O crescimento respiratório apresenta diferentes características metabólicas e cinéticas (Figura 5). Em condições *in vitro*, por exemplo, após um breve período de adaptação em meio de cultura rico em nutrientes com alta concentração de glicose, chamado de fase Lag, as células aumentam sua taxa proliferativa (fase exponencial de crescimento) com energia proveniente da fermentação da glicose. A depleção de glicose no meio induz a desrepressão catabólica (transição diáuxica) resultando numa parada transiente da divisão celular, enquanto as células se preparam para o metabolismo respiratório. Após esse período, a levedura retoma seu crescimento, em um ritmo mais lento, utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária de crescimento, na qual podem sobreviver durante muito tempo na ausência de nutrientes (PRINGLE; HARTWELL, 1982; FUGE; WERNER, 1997).

#### 1.4.1.5.2 Mutagênese

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto amplamente estudado em pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos envolvidos no estresse oxidativo (COSTA; FERREIRA, 2001).

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos, servindo para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (HENRIQUES *et al.*, 1987; POLI *et al.*, 1999; TERZIYSKA *et al.*, 2000). Estes ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis. Além disso, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P450) e de detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (PAULA-RAMOS *et al.*, 1991; MORENO *et al.*, 1991; POLI *et al.*, 1999).

Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes ensaios se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (ZIMMERMANN, 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um códon que determina um aminoácido para um códon de terminação da síntese protéica) (ATKIN *et al.*, 1993). A reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por supressor do gene mutante original (HENRIQUES *et al.*, 1987).

Para que seja identificada a mutação reversa é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c, isolada por Von Borstel (PARRY; PARRY, 1984). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo ocre *lys1-1* (alteração no códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10* (BOEIRA *et al.*, 2002). As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio de cultura seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente ou está em quantidades muito pequenas.

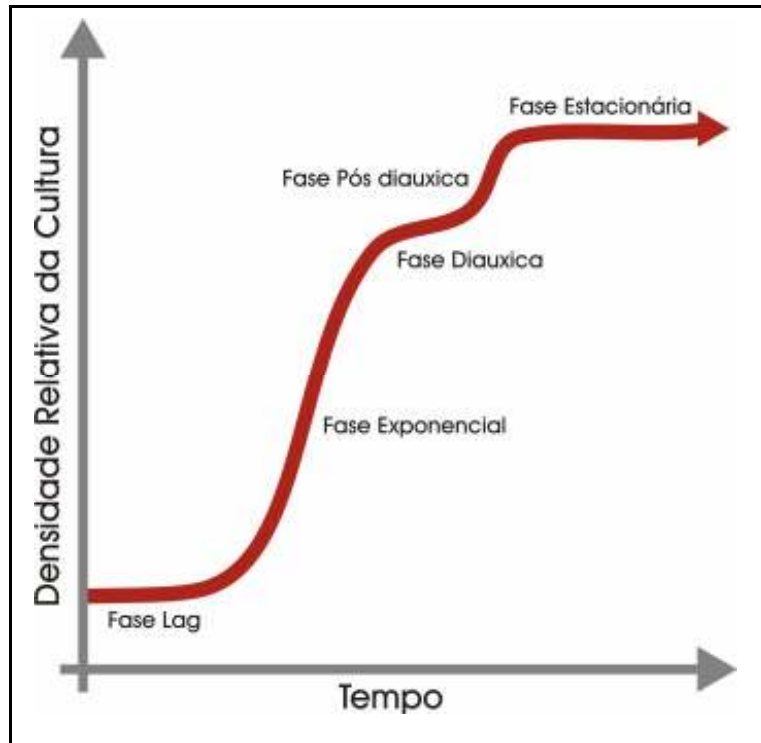


Figura 5 - Curva de crescimento de *S. cerevisiae*  
Fonte: Fuge e Werner (1997)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado do óleo-resina da planta *Copaifera langsdorffii* em modelos *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar e comparar o potencial genotóxico *in vitro* do ácido caurenóico em linfócitos humanos e células tumorais leucêmicas (HL60) através do Teste do Cometa;
- Avaliar a cinética de reparo do dano ao DNA induzido pelo ácido caurenóico em linfócitos humanos através do Teste do Cometa;
- Determinar o potencial de indução de micronúcleos *in vitro* e *in vivo* induzido pelo ácido caurenóico, em linfócitos humanos e células da medula óssea de camundongos, respectivamente;
- Estimar a indução de aberrações cromossômicas induzidas pelo ácido caurenóico sobre linfócitos humanos;
- Avaliar o potencial mutagênico do ácido caurenóico em modelo de mutagênese em *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais Utilizados

##### 3.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético (DONNER, Modelo AD8850)
- Balança para pesagem de animais (FILIZOLA, Modelo ID-1500)
- Banho maria (Delta Modelo 105DI)
- Centrífuga de placas (Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403)
- Cuba horizontal de eletroforese (BioRad)
- Estufa de secagem e esterilização (FANEM, Modelo 315SE)
- Fluxo laminar vertical (VECO)
- Fonte para eletroforese (Life Technologies, Modelo 250)
- Incubadora com agitação orbital (LABLINE)
- Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator NUAIRE TS Autoflow)
- Microscópio de fluorescência (Olympus, Modelo BX41)
- Microscópio óptico (Metrimpex Hungary/PZO-Labimex, Modelo Studar lab)
- Microscópio óptico de inversão (Nikon Diaphot)

##### 3.1.2 Soluções e Reagentes

- Ácido acético P.A. (MERCK)
- Ácido clorídrico 0,1 N (VETEC)
- Agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen)
- Agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen)
- Álcool etílico P.A. (VETEC)
- Bacto-ágar (VETEC)

- Ciclofosfamida (Genexual 1000 mg, ASTA MÉDICA)
- Citocalasina B (SIGMA)
- Colchicina (SIGMA)
- Corante de Leishman (MERCK)
- DMSO (VETEC)
- Doxorubicina (ZODIAC)
- EDTA (PROQUÍMICOS)
- Entellan (MERCK)
- Extrato de levedura a 1% (Difco)
- Fitohemaglutinina (CULTILAB)
- Histopaque (SIGMA)
- Meio de cultura celular RPMI 1640 (CULTILAB)
- Metanol P.A. (MERCK)
- Metil-metano-sulfonado (SIGMA)
- NaOH 10M (VETEC)
- Nitroquinoleína-1-óxido (SIGMA)
- Penicilina-estreptomicina (CULTILAB)
- Solução de acridina laranja (100 µg/mL) em água destilada (FLUKA)
- Solução de Azul de Tripan a 4% em água destilada (SIGMA)
- Solução de bactopectona a 2% (Difco)
- Solução de Brometo de etídio (20µg/mL) em água destilada (GIBCO)
- Solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (PBS) (SIGMA)
- Solução de glicose a 2% (Difco)
- Solução de KCl (0,075 M) em água destilada (LABSYNTH)
- Solução de Triton X-100 a 1% (Vetec)
- Solução salina 0,9% (LABSYNTH)
- Solução tampão fosfato pH 6,8 ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , LABSYNTH)
- Soro fetal bovino (CULTILAB)
- Tripsina 0,25% (CULTILAB)
- Tris (PROQUÍMICOS)

### 3.2 Isolamento do Ácido Caurenóico

O isolamento do ácido caurenóico foi realizado no Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a supervisão do professor Edilberto da Rocha Silveira, de acordo com Costa-Lotufo *et al.* (2002).

### 3.3 Linhagens Celulares

#### 3.3.1 Isolamento dos Linfócitos

Os linfócitos foram isolados através de um gradiente de densidade. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de histopaque e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do histopaque, em três camadas visíveis. Uma superior (soro), uma intermediária (linfócitos e histopaque) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada “nuvem de linfócitos” foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos foi ressuscitado em 2mL de PBS. Os linfócitos foram utilizados imediatamente após o processo de isolamento.

#### 3.3.2 Manutenção e Cultivo da Linhagem Celular Tumoral HL60

A linhagem celular tumoral HL60 (leucemia pró-mielocítica humana) foi obtida pelo Children's Mercy Hospital em Kansas City – EUA. A linhagem foi cultivada em frascos plásticos para cultura (75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando

necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  células/mL (BUTLER; DAWSON, 1992).

### 3.4 Estudo de Mecanismos de Ação

#### 3.4.1 Viabilidade Celular – Exclusão pro Azul de Tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o azul de tripan para fora, sendo possível, dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células mortas.

Linfócitos ( $0,5 \times 10^5$  células/mL) e células da linhagem HL60 ( $0,3 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas durante 4 e 24 horas com ácido caurenóico (10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) e examinados ao microscópio de inversão. Foi retirado 90  $\mu\text{L}$  da suspensão celular e adicionado a 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada com controle positivo (VERAS *et al.*, 2004).

##### 3.4.1.1 Análise estatística

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.2 Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja

O método de coloração pelo brometo de etídio/acridina laranja (McGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, através da coloração diferencial por fluorescência. Este método



baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e acridina laranja (AL) no núcleo. A acridina laranja intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado, majoritariamente, por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha.

As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela AL. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes presentes no núcleo (condensação de cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpúsculos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et al.*, 2005).

Linfócitos ( $0,5 \times 10^5$  células/mL) e células da linhagem HL60 ( $0,3 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas durante 24 horas com ácido caurenóico (10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ). As suspensões de células foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas por 5 minutos em baixa rotação. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 20 $\mu\text{L}$  de solução de PBS. Em seguida, 1 $\mu\text{L}$  da solução BE/AL foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferida para lâminas e montadas com lamínulas. E em seguida, as lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como controle positivo (GENG *et al.*, 2003).

#### 3.4.2.1 Análise Estatística

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.3 Avaliação da Inibição da Atividade da Enzima Topoisomerase I pelo Método de Relaxamento do DNA

O efeito inibitório do ácido caurenóico sobre a enzima topoisomerase-I foi avaliado através de um kit comercial enzimático (*Topo I Drug Screening Kit* da TopoGen, Inc.). O plasmídeo de DNA (250 e 500 ng) super-compactado foi incubado com a enzima purificada humana topoisomerase I (4 unidades) a 37°C por 30 minutos em solução de relaxamento (10mM Tris, pH 7,9; 1mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1% BSA, 0,1 mM espermidina, 5% glicerol) na ausência ou presença de 10 e 30 µg/mL de ácido caurenóico. Camptotecina (0,1 mM) foi utilizada como controle positivo. A reação foi finalizada mediante a adição de 10% de SDS (2µL) e proteinase K (50 µg/mL). Amostras de DNA foram coradas com azul de bromofenol e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Após a eletroforese, o gel de corrida foi corado com brometo de etídio para ser analisado.

## 3.5 Teste do Cometa

### 3.5.1 Seleção de Voluntários e Obtenção do Material para Análise

Para o estudo com linfócitos humanos, foi utilizado sangue periférico de quatro doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

- ter entre 18 e 25 anos;
- estar em bom estado clínico de saúde;
- não fumante e não etilista;
- não estar fazendo uso de algum medicamento.

A coleta do material (sangue periférico retirado da veia cefálica ou basílica) foi realizada por profissionais capacitados, nas dependências da UNIFAC (Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará - UFC), utilizando seringa esterilizada e descartável.

### 3.5.2 Tratamentos

#### 3.5.2.1 Avaliação Comparativa do Potencial Genotóxico sobre Linfócitos e HL60

Os linfócitos ( $0,5 \times 10^5$  células/mL), assim como a linhagem HL60 ( $0,3 \times 10^6$  células/mL) foram cultivados em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, na presença de concentrações crescentes de ácido caurenóico (10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 4 e 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1%) como controle negativo (BAUMGARTNER *et al.*, 2004). Neste experimento, os linfócitos não foram estimulados com nenhum agente mitogênico externo.

#### 3.5.2.2 Reparo do DNA em Linfócitos

Para o estudo de reparo de lesões no DNA, os linfócitos foram cultivados nas mesmas condições do ensaio anterior (3.5.2.1.). O estudo do potencial genotóxico avaliado pelo ensaio do cometa, não, necessariamente, requer o uso de células em proliferação. Porém, para se estudar a cinética de reparo das lesões no DNA, o efeito mitogênico é importante devido a expressão de uma gama de enzimas envolvidas nos processos de reparo (KAMINSKAS; LI, 1992). Portanto, neste ensaio, os linfócitos foram estimulados com fitohemaglutinina para induzir sua proliferação. Dois dias após o estímulo mitogênico, os linfócitos foram incubados com ácido caurenóico (10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) por 4 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas como RPMI 1640, centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e re-incubadas, na ausência do ácido caurenóico. Alíquotas da suspensão celular foram analisadas depois de 2, 4, 6, 24 e 48 horas para avaliar a cinética de reparo das lesões induzidas pelo ácido caurenóico.

### 3.5.3 Execução do Teste do Cometa

#### 1) Preparação das Lâminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação. As células tratadas foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas as lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

## 2) Lise Celular

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 hora.

## 3) Neutralização e Eletroforese

Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Posterior a esta etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 300 mM NaOH, pH > 13,0). As lâminas repousaram por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcalilábeis em quebra de fitas simples. A eletroforese (25 V; 300 mA) foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos. Todos esses passos foram realizados na ausência de luz. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

## 4) Coloração e Análise

Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 6). Foram contados 100 cometas por lâmina (LOVELL *et al.*, 1999) e classificados, por análise

visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:  $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$ , onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

### 3.5.4 Análise Estatística

Para análise estatística dos experimentos, foram utilizados os testes ANOVA e Tukey no software Prism® versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

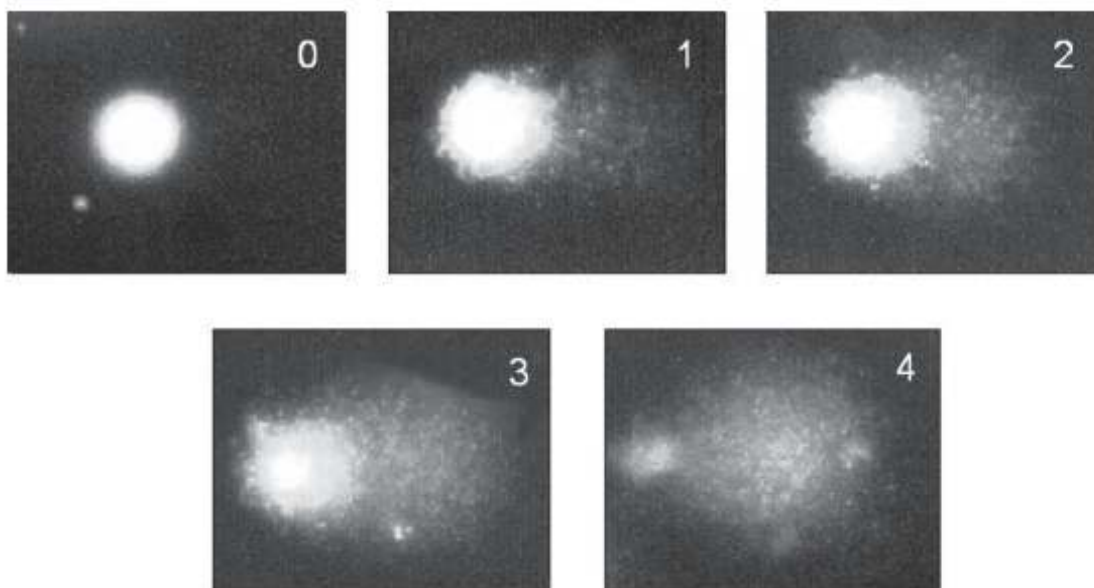


Figura 6 - Tipos de cometa. Classificação por categoria de dano: (0) sem dano (< 5%); (1) Baixo nível de dano (5 - 20%); (2) médio nível de dano (20 - 40%); (3) alto nível de dano (40 - 95%); (4) dano máximo (> 95%)

Fonte: Collins (2004)

## 3.6 Teste do Micronúcleo *in vivo*

### 3.6.1 Animais e Ambiente de Experimentação

Os animais utilizados neste estudo, camundongos machos Swiss, com 6 a 8 semanas de idade foram oriundos e mantidos no Biotério da Universidade Federal do Ceará. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas (5 animais/gaiola), forradas com maravalha autoclavada, em ambiente controlado com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade em torno de 60%, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição.

### 3.6.2 Grupos amostrais

O estudo incluiu cinco grupos de animais (camundongos machos), subdivididos em dois subgrupos (A e B), de acordo com o tempo de sacrifício após o tratamento. Todos os animais foram pesados, marcados, divididos aleatoriamente e distribuídos de acordo com o tratamento ao qual foram submetidos. Divisão dos grupos:

#### 1) Grupo Controle Negativo

Subgrupo A<sub>1</sub> formado por oito animais, os quais foram sacrificados 24 horas após o tratamento com solução de DMSO a 0,1%, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso);

Subgrupo B<sub>1</sub> formado por oito animais, os quais foram sacrificados 48 horas após o tratamento com solução de DMSO a 0,1%, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso).

#### 2) Grupo Controle Positivo

Subgrupo A<sub>2</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 24 horas após o tratamento com ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso);

Subgrupo B<sub>2</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 48 horas após o tratamento com ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso).

#### 3) Grupo Ácido Caurenóico 25 mg/kg

Subgrupo A<sub>3</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 24 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 25 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso);

Subgrupo B<sub>3</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 48 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 25 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso).

#### 4) Grupo Ácido Caurenóico 50 mg/kg

Subgrupo A<sub>4</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 24 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 50 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso);

Subgrupo B<sub>4</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 48 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 50 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso).

#### 5) Grupo Ácido Caurenóico 100 mg/kg

Subgrupo A<sub>5</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 24 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 100 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso);

Subgrupo B<sub>5</sub> formado de oito animais, os quais foram sacrificados 48 horas após o tratamento com ácido caurenóico (DMSO, 0,1%) na dose de 100 mg/kg, por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso).

### 3.6.3 Obtenção e Preparação do Material para Análise

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 e 48 horas após o tratamento. Os fêmures foram retirados, limpos e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringas de 5 mL previamente preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo de centrifuga contendo 3 mL de soro fetal bovino. Após a obtenção do material medular, este foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos), o

sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado. Uma gota da suspensão de células foi transferida para uma lâmina limpa e seca, sendo, em seguida, realizado o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas para cada animal, correspondente aos subgrupos tratados. Vinte e quatro horas após a confecção das lâminas, o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. As lâminas foram montadas com entellan (SCHIMID, 1975).

#### 3.6.4 Análise de Micronúcleo

Toda a análise foi realizada em teste cego, utilizando microscópio óptico binocular, com objetivas de 20X e 40X. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Schmid (1976) e Heddle *et al.*, (1983). Assim, foram considerados micronúcleos as estruturas tipicamente arredondadas, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro dos eritrócitos jovens identificados pela coloração azulada (RABELLO-GAY, 1991). Um total de 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) foi analisado, através da leitura de duas lâminas por animal (HEDDLE *et al.*, 1983).

#### 3.6.5 Análise Estatística

A análise estatística, referente à ocorrência de micronúcleo nos grupos controle e expostos às diferentes doses de ácido caurenóico, foi feita com o uso do Teste t de Student. Sendo os resultados considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

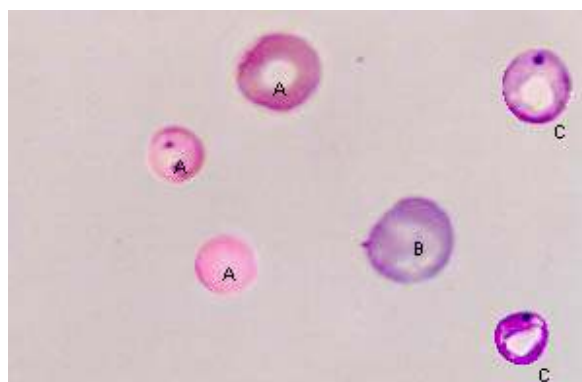


Figura 7 -. Eritrócito normocromático (A), eritrócito policromático (B) e eritrócito policromático micronucleado (C)

Fonte: Ribeiro *et al.* (2003)



### 3.7 Teste do Micronúcleo *in vitro*

#### 3.7.1 Tratamento

Os linfócitos ( $0,5 \times 10^5$  células/mL) foram cultivados em frascos de cultura contendo RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 3% de fitohemaglutinina durante 72 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 24 horas de cultivo, ácido caurenóico (10, 30 e 60 µg/mL) foi adicionado as culturas. Após 44 horas do início do cultivo, citocalasina B (3 µg/mL) foi acrescida as culturas. Metil-metano-sulfonado (MMS) foi utilizado como controle positivo ( $4 \times 10^{-5}$ M) e o DMSO (0,1%) como controle negativo.

#### 3.7.2 Fixação das Células

Ao final das 72 horas de incubação, as culturas foram centrifugadas (1000 rpm durante 5 minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado em solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M (37°C), tendo permanecido na incubadora por 20 minutos a 37°C. Após o tratamento hipotônico, a suspensão celular foi centrifugada (1000 rpm por 5 minutos), sendo o sobrenadante desprezado em seguida.

O pellet foi fixado com uma solução fixadora (metanol/ácido acético, 3:1) mantida previamente gelada (4°C). O processo de fixação foi realizado três vezes. Na última, o pellet foi ressuscitado em 1mL da solução de fixação gelada até a preparação das lâminas.

#### 3.7.3 Preparação das Lâminas

Duas a quatro gotas (dependendo da quantidade do material) da suspensão celular foram transferidas para lâminas limpa e seca. Após a montagem das lâminas, estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 minutos. Foram montadas cinco lâminas para cada cultura.

### 3.7.4 Análise de Micronúcleo

As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, em microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000). Assim, somente células binucleadas (1000 células/lâmina) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas (Figura 8).

### 3.7.5 Análise Estatística

Para análise estatística dos experimentos, foi utilizado os testes ANOVA e Tukey no software Prism® versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

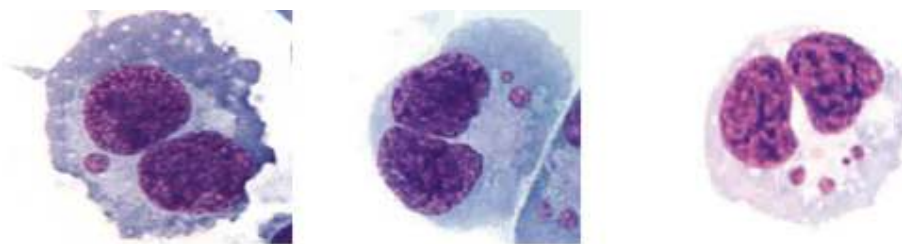


Figura 8 - Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos

Fonte: Fenech *et al.* (2003)

## 3.8 Aberrações Cromossômicas

Os linfócitos ( $0,5 \times 10^5$  células/mL) foram cultivados em frascos de cultura contendo RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 3% de fitohemaglutinina durante 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Duas horas antes do término do tempo de incubação, foi adicionada em todas as culturas uma solução de colchicina (0,0016%) para a obtenção de metáfases. Posterior ao tempo de cultivo, as culturas foram fixadas com uma solução fixadora (metanol/ácido acético, 3:1) mantida previamente gelada ( $4^\circ\text{C}$ ).

A capacidade do ácido caurenóico em induzir aberrações cromossômicas foi avaliada em diferentes fases do ciclo celular ( $G_1$ , S e  $G_2$ ) (Tabela 1) de acordo com

Pessoa *et al.*, (2003). Em todos os experimentos, o ácido caurenóico foi testado nas concentrações de 10, 30 e 60 µg/mL.

### 3.8.1 Tratamentos

1) Para avaliar o efeito do ácido caurenóico na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, o ácido caurenóico foi adicionado no início da cultura (tempo zero).

2) Para avaliar a fase de transição G<sub>1</sub>-S, o ácido caurenóico foi adicionado a cultura 24 horas após o início de cultivo.

3) Com a finalidade de verificar de forma mais específica o efeito do ácido caurenóico sobre a fase S, foi realizado testes de pulso. Nos quais os linfócitos, após 24 horas de cultivo, foram expostos ao ácido caurenóico em intervalos de 1 e 6 horas em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino e sem antibióticos. Após os testes de pulso, as culturas foram centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante descartado. Posteriormente as células foram recultivadas nas mesmas condições das outras culturas.

4) Para avaliar o efeito do ácido caurenóico na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular, as culturas foram tratadas por 3 horas após 69 horas do início do cultivo.

Tabela 1 - Protocolo de tratamento de linfócitos com ácido caurenóico nas fases do ciclo celular

Tratamento	PHA	AC	s/SFB	Lavagem	Col	Fix
G <sub>1</sub>	0h	0h	-	-	70h	72h
G <sub>1</sub> -S	0h	24h	-	-	70h	72h
S – 1 hora	0h	24h	24h	25h	70h	72h
S – 6 horas	0h	24h	24h	30h	70h	72h
G <sub>2</sub>	0h	69h	-	-	70h	72h

Obs: PHA – fitohemaglutinina; AC – ácido caurenóico; s/SFB – meio sem soro fetal bovino; Col – colchicina (0,0016%); Fix – fixação.

### 3.8.2 Preparação das Lâminas

Duas a quatro gotas (dependendo da quantidade do material) da suspensão celular foram transferidas para lâminas limpa e seca. Após a montagem das lâminas,

estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 minutos. Foram montadas cinco lâminas para cada cultura.

### 3.8.3 Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com a finalidade de se detectar possíveis alterações cromossômicas estruturais ou numéricas nas metáfases dos linfócitos. Os cromossomos foram analisados com a objetiva de imersão (100 x), em lâminas codificadas, observando-se a posição do centrômero, alterações no grau de ploidia e aberrações estruturais segundo Rabelo-Gay *et al.* (1991).

#### 3.8.3.1 Critérios de análise

Os parâmetros analisados foram a frequência de células com aberrações cromossômicas em 100 metáfases/cultura e o índice mitótico (IM), determinado pela contagem do número de metáfases em 2000 linfoblastos/cultura (MOORHEAD *et al.*, 1960). O IM foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de metáfases}}{\text{Número total de linfoblastos}} \times 100$$

### 3.8.4 Análise Estatística

Para análise estatística do índice mitótico, foi utilizado os teste ANOVA e o teste t de Student foi utilizado para comparar as frequências de células aberrantes em relação aos controles, no software Prism® versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 3.9 Teste de Mutagenicidade em *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.9.1 Linhagem e Meios de Cultura

Para o ensaio de mutagenicidade foi utilizada a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c (R.C. von Borstel, Edmonton, Canadá), cujo genótipo relevante é: MAT $\alpha$  *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*.

Meios, soluções e tampões foram preparados de acordo com Burke *et al.*, 2000. O meio líquido completo (YPD) contendo 0,5% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de dextrose, foi utilizado, rotineiramente, para o crescimento celular. Para o plaqueamento, o meio YPD foi solidificado com 2% de bactoagar. Para o estudo de toxicidade celular (teste de sobrevivência), foi utilizado o meio sintético completo (SC). O meio SC é formado pelo meio mínimo de cultura (MM – 0,67% de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 2% de glicose e 2% de bactoagar) suplementado com aminoácidos (adenina, arginina, lisina, histidina, leucina, metionina, uracila, triptofano e treonina). Para o ensaio de mutagênese, foi utilizado meio de cultura incompleto contendo baixas concentrações de lisina, histidina e metionina.

Para todos os tratamentos, as células foram ressuspendidas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). A solução de PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM, pH 5,8) foi utilizada para a incubação celular nas fases exponencial e estacionária sem crescimento.

### 3.9.2 Condições de Crescimento de *S. cerevisiae*

Culturas de células em fase estacionária foram obtidas por inoculação de uma colônia isolada em meio líquido YPD. Após 72 horas de incubação a 30°C sob agitação, as culturas continham em torno de 2 a 3 x 10<sup>8</sup> células/mL.

Culturas em fase exponencial de crescimento, foram obtidas pela inoculação de 5 x 10<sup>5</sup> células em fase estacionária/mL e cultivadas em meio líquido YPD. Após 18 horas de incubação a 30°C sob agitação, as culturas apresentavam um densidade celular em torno de 1 a 2 x 10<sup>7</sup> células/mL, com 20 a 30% de leveduras em divisão celular (brotamento). As células foram lavadas em PBS e a densidade celular e a percentagem de brotamento na cultura, foi determinada mediante contagem, usando-se microscópio óptico e câmara de Neubauer.

### 3.9.3 Teste de Sobrevivência

O teste de sobrevivência foi determinado pela inoculação de  $5 \times 10^5$  células/mL em fase exponencial de crescimento em meio líquido YPD na presença de concentrações crescentes de ácido caurenóico (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/mL) a 30°C sob agitação por 18 horas. O número de células foi determinado por contagem com o auxílio de microscópio óptico e a capacidade formadora de colônias, foi determinada através de uma pequena alíquota semeada em meio sólido YPD. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 5 dias antes da contagem.

Para avaliação do efeito do ácido caurenóico em condições de não crescimento, as células em fases estacionária e exponencial de crescimento foram cultivadas em PBS numa densidade de  $2 \times 10^8$  células/mL e tratadas da mesma maneira como descrito acima. O composto óxido de nitroquinolina (4-NQO) foi utilizado como controle positivo. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

#### 3.9.4 Detecção da Atividade Mutagênica induzida pelo Ácido Caurenóico

Uma suspensão celular ( $2 \times 10^8$  células/mL) em fase exponencial ou estacionária de crescimento foi incubada por 18 horas com diferentes concentrações de ácido caurenóico (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/mL). A sobrevivência foi determinada através da semeadura em meio sintético completo (SC) após 3 a 5 dias de crescimento a 30°C e a indução de mutações (reversões nos locos LYS, HIS ou HOM) foi determinada através da semeadura em meio de cultura incompleto apropriado após 7 a 10 dias de crescimento a 30°C. A mutação *hisI-7* é um alelo de sentido incorreto (*missense*) do tipo não supressiva, e, portanto, as reversões são resultantes de mutações no próprio locus (SNOW, 1978). Entretanto, o alelo *lysI-1* corresponde a uma mutação do tipo supressiva ocre sem sentido (*nonsense*), a qual pode ser revertida de forma locus específico ou através de uma mutação para frente (*forward mutation*) em um gene supressor. A diferença entre as reversões verdadeiras e mutações supressoras (*forward*) no locus *lysI-1* está bem descrita por Schüller & Von Borstel (1974), onde o conteúdo de adenina reduzido no meio SC sem lisina (SC-lys) mostra reversão no locus quando as colônias são vermelhas e mutações supressoras quando as colônias ficam brancas. Acredita-se que *hom3-10* contenha mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*), devido a sua resposta a uma série de agentes, sabidamente, mutagênicos

(Von BORSTEL *et al.*, 1971). O composto óxido de nitroquinolina (4-NQO) foi utilizado como controle positivo. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

### 3.9.5 Análise Estatística

Para análise estatística da mutagênese e teste de sobrevivência, foram utilizados os testes ANOVA e o teste de Dunett, no software Prism® versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade Celular – Exclusão Por Azul De Tripan

A análise da viabilidade celular em linhagens leucêmicas e em linfócitos humanos foi avaliada após dois tempos de tratamento diferentes (4 e 24 horas). Depois de 4 horas de exposição, o ácido caurenóico causou uma significativa redução no número de linfócitos viáveis apenas na maior concentração avaliada ( $p < 0,05$ ) e nas concentrações de 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$  em HL60 ( $p < 0,05$ ). Foi observado para os dois tipos de células, um aumento significativo no número de células não viáveis nas concentrações de 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ . Após 24 horas de tratamento, o ácido caurenóico reduziu de modo significativo o número de células viáveis, assim como, induziu um aumento no número de células não viáveis, em todas as concentrações, tanto para linfócitos como para HL60 ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos de linfócitos e de HL60 tratados durante 4 horas e nem com os grupos tratados por 24 horas, em todas as concentrações avaliadas (10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ). O ácido caurenóico induziu efeitos similares em ambas as linhagens celulares. Porém, houve diferença significativa entre os grupos (linfócitos e HL60) expostos durante 4 e 24 horas, em todas as concentrações de ácido caurenóico avaliadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

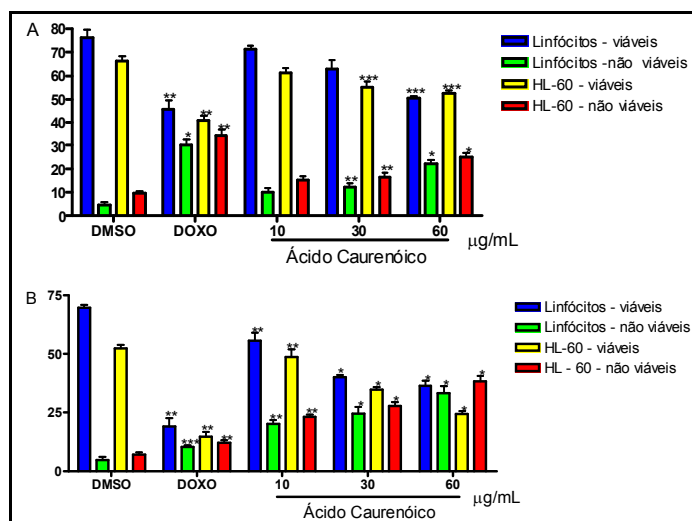


Figura 9 - Efeito do ácido caurenóico sobre a viabilidade celular de linfócitos humanos e células leucêmicas HL60 após 4 horas de (A) e 24 horas (B) de exposição determinada por exclusão de azul de tripan. O veículo utilizado para diluir a droga, DMSO (0,1%), foi utilizado como controle negativo e a doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls



## 4.2 Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja

Após as células (linfócitos e HL60) terem sido tratadas com ácido caurenóico por 24 horas, foi observado um significativo aumento no número de células apoptóticas e necróticas (Figura 10) para ambas as linhagens, em todas as concentrações testadas. Os processos apoptótico e necrótico induzidos pelo ácido caurenóico ocorreram de forma dependente de concentração ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Os efeitos induzidos pelo ácido caurenóico apresentaram o mesmo perfil para ambas as linhagens.

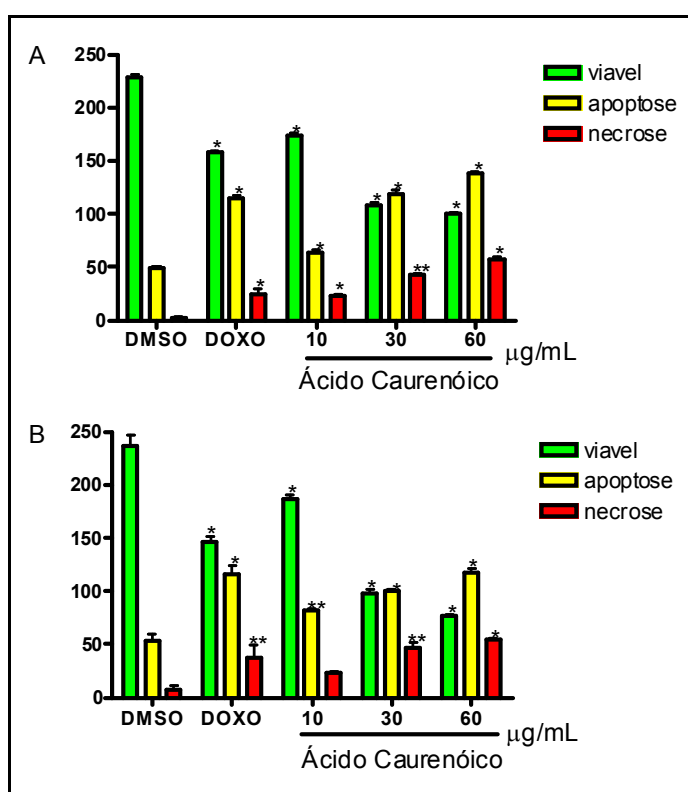


Figura 10 - Efeito do ácido caurenóico em linfócitos humanos (A) e células leucêmicas HL60 (B) analisados pela coloração diferencial por brometo de etídio/acridina laranja após 24 horas de exposição. O veículo utilizado para diluir a droga, DMSO (0,1%), foi utilizado como controle negativo e a doxorrubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls

## 4.3 Efeito do Ácido Caurenóico Sobre a Enzima Topoisomerase I

Neste ensaio, a enzima topoisomerase I foi incubada com ácido caurenóico (10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença DNA super-compactado (plasmídio circular), após o tempo de incubação, os produtos dessa reação foram submetidos a eletroforese para separar o DNA circular aberto (relaxado) ou fechado (compactado). Após a eletroforese pôde-se verificar que o ácido caurenóico inibiu o relaxamento do DNA nas concentrações testadas (Figura 11 A).

Para averiguar se o ácido caurenóico interage diretamente com a enzima ou com o DNA, a concentração do DNA no sistema de reação foi dobrada. Após o aumento na concentração do DNA, foi observada a recuperação da atividade da enzima (Figura 11). Estes achados sugerem que o ácido caurenóico interage ou intercala com o DNA e não com a enzima.

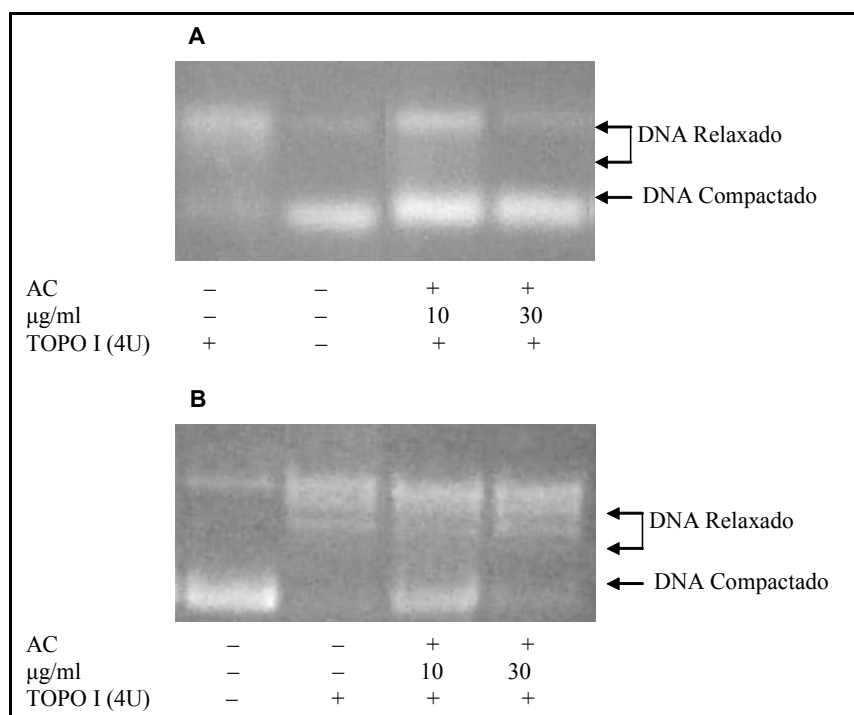


Figura 11 - Efeito do ácido caurenóico sobre a ação da enzima topoisomerase I (TOPO I). **A.** 250 ng de DNA supercompactado foi incubado com 4 unidades de topoisomerase I na presença e na ausência de ácido caurenóico (10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ). **B.** 500 ng de DNA supercompactado foi incubado com 4 unidades de topoisomerase I na presença e na ausência de ácido caurenóico (10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ). O relaxamento do DNA foi analisado após eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi corado com brometo de etídio e revelado com auxílio de luz ultravioleta

#### 4.4 Avaliação do Teste do Cometa

#### 4.4.1 Avaliação Comparativa do Potencial Genotóxico do Ácido Caurenóico sobre Linfócitos Humanos e HL60

Para a análise comparativa, o índice de dano (ID) ao DNA foi utilizado. O ID reflete a extensão de DNA lesionado. Os valores para o ID podem variar de 0 a 400 (unidades arbitrárias). Foi observado um aumento significativo no ID após o tratamento, tanto para 4 como para 24 horas de exposição, ao ácido caurenóico (Figuras 12 e 13) para linfócitos e HL60, nas concentrações 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ). O tratamento de 24 horas resultou em um maior índice de dano em relação aos grupos expostos ao ácido caurenóico por um período de exposição de 4 horas. Porém, comparando-se os grupos tratados pelo mesmo período de exposição, não houve diferença significativa entre eles.

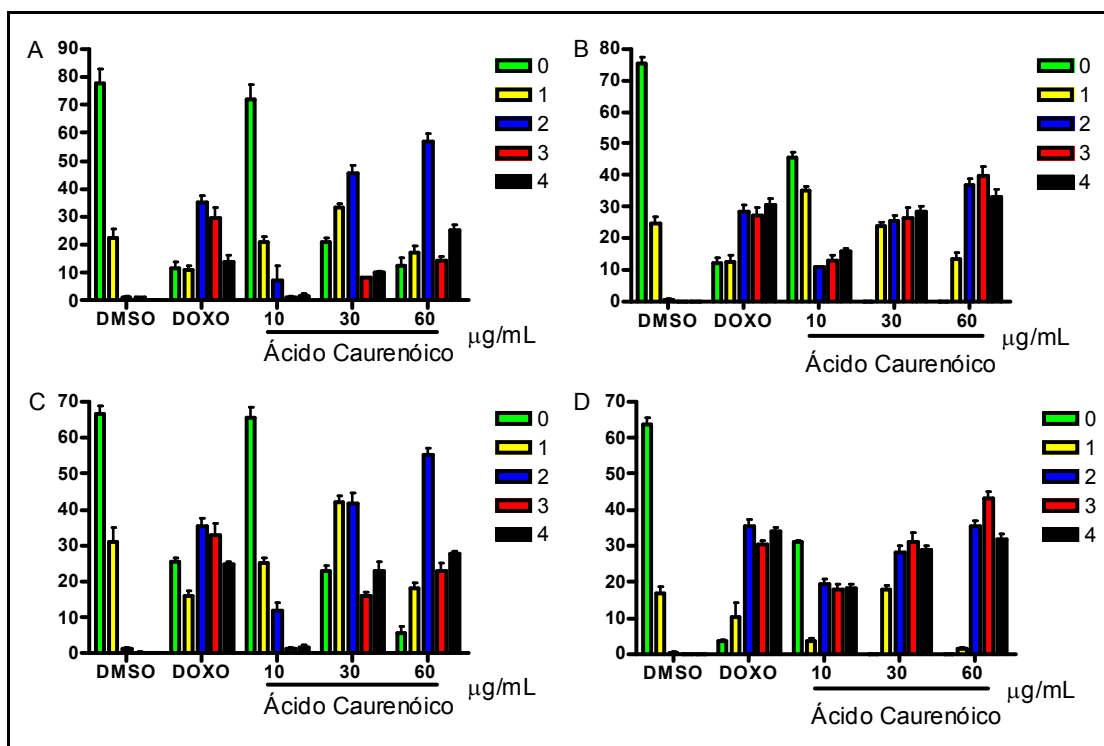


Figura 12 - Distribuição das classes de cometas (0 – sem danos a 4 – dano máximo) em linfócitos humanos expostos durante 4 (A) e 24 horas (B) e células leucêmicas HL60 expostas por 4 (C) e 24 horas (D) ao ácido caurenóico analisados pelo teste do cometa

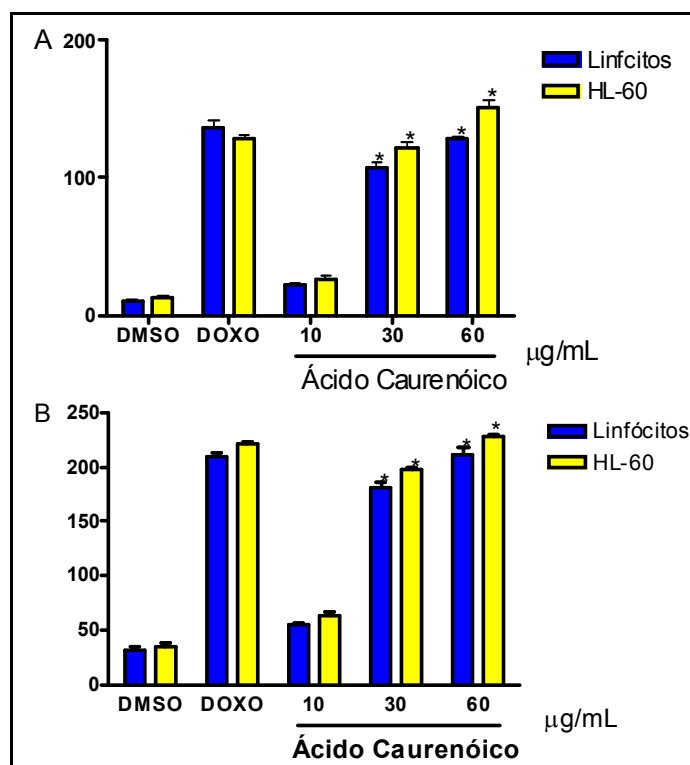


Figura 13 - Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos e células leucêmicas HL60 tratadas com ácido caurenóico durante 4 (A) e 24 horas (B) determinado pelo teste do cometa. O veículo utilizado para diluir a droga, DMSO (0,1%), foi utilizado como controle negativo e a doxorrubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Tukey

#### 4.4.2 Reparo do DNA

Com o objetivo de investigar se as lesões ao DNA induzidas pelo ácido caurenóico são passíveis de reparo, os linfócitos foram incubados com diferentes concentrações de ácido caurenóico por 4 horas e, posteriormente, re-cultivadas na ausência da droga. Pequenas alíquotas celulares foram analisadas em diferentes tempos (2, 4, 6, 24 e 48 horas) de reparo. Nesta análise, o ID e a frequência de dano (FD) ao DNA foram utilizados como parâmetros para avaliar a cinética de reparo das lesões no material genético.

Nas culturas de linfócitos tratadas com 10 e 30µg/mL de ácido caurenóico, os índices e as frequências de dano ao DNA foram reduzidos significativamente após as primeiras 4 horas do tempo de reparo ( $p < 0,05$ ). O início do reparo das lesões induzidas pelo ácido caurenóico na concentração de 60µg/mL foi mais tardio. Somente após 6 horas foi observada uma redução significativa de ID e FD ( $p < 0,01$ ). As figuras 14 e 15 mostram a

cinética de reparo das lesões induzidas no DNA por diferentes concentrações de ácido caurenóico. Após 48 horas de cultivo na ausência da droga, mais de 80% das lesões foram reparadas, em todas as culturas expostas ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

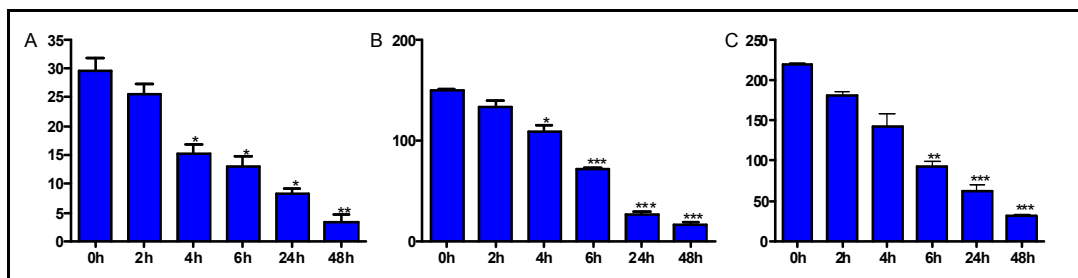


Figura 14 - Redução do índice de dano ao DNA em linfócitos humanos tratados durante 4 horas (tempo 0 h) com ácido caurenóico nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 µg/mL (C) e re-cultivados na ausência da droga (2 a 48h). Os dados correspondem à média ± DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o controle (tempo 0h) por ANOVA seguido por Tukey.

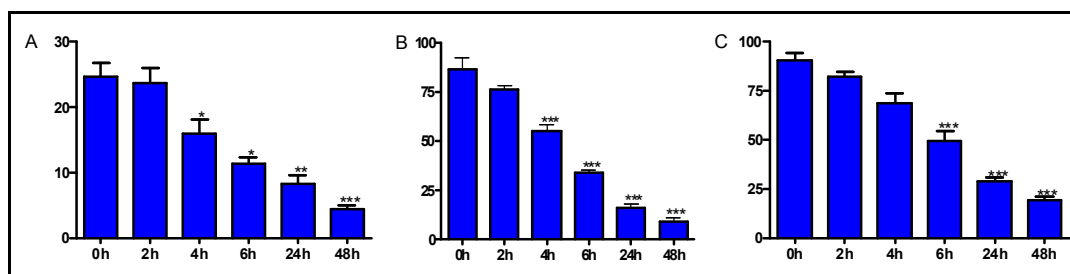


Figura 15 - Redução da frequência de dano ao DNA em linfócitos humanos tratados durante 4 horas (tempo 0 h) com ácido caurenóico nas concentrações de 10 (A), 30 (B) e 60 µg/mL (C) e re-cultivados na ausência da droga (2 a 48h). Os dados correspondem à média ± DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o controle (tempo 0h) por ANOVA seguido por Tukey

#### 4.5 Análise de Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongo

Para a análise de indução de micronúcleos em células da medula óssea, foi administrada, em uma única dose, ácido caurenóico nas concentrações de 25, 50 e 100mg/mL, por via intraperitoneal. Para a verificação da ocorrência de micronúcleos, foram analisados tanto eritrócitos policromáticos (EPC) quanto os normocromáticos (ENC) de camundongos sacrificados 24 e 48 horas após a administração da droga (Tabela 2).

O ácido caurenóico induziu a formação de micronúcleos em todas as doses testadas nos grupos sacrificados 24 e 48 horas após o tratamento. Contudo, no grupo de animais sacrificados após 48 horas de tratamento, a média de micronúcleos por 1000 EPC analisados

foi relativamente menor em comparação a média do grupo sacrificado 24 horas após o tratamento com ácido caurenóico nas doses de 50 e 100 mg/mL. Comparando-se a razão EPC/ENC dos grupos sacrificados 48 horas após o tratamento em relação a mesma razão do grupo controle, observa-se uma diminuição dessa razão para valores abaixo de 1, nas doses de 50 e 100 mg/mL, observando-se portanto, uma toxicidade do ácido caurenóico na medula óssea, de modo dose - dependente.

Tabela 2 - Frequência de Micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos após o tratamento com ácido caurenóico (AC) e a relação entre EPC e ENC (eritrócitos normocromáticos) em diferentes doses e tempos pós-tratamento

Dose mg/mL	T <sup>c</sup>	N <sup>o</sup>	Micronúcleos/1000 EPC/animal								Média ± DP <sup>d</sup>	Relação EPC/ENC	
			Dados individuais										
DMSO <sup>a</sup>	24h	8	1	0	0	5	0	3	6	0	1,87±2,45	0,86	
	48h	8	1	0	1	1	0	2	3	0	1,00±1,06	0,91	
Ciclofosfamida <sup>b</sup>	24h	8	23	16	19	12	20	15	18	17	17,50±3,33	0,62	
	48h	8	15	26	29	15	21	18	23	17	20,50±5,18	0,58	
AC	25	24h	8	11	8	11	5	0	4	9	7	6,87±3,75*	0,82
		48h	8	8	1	1	12	14	8	5	13	7,75±5,12***	0,75
	50	24h	8	12	14	16	7	10	5	8	10	10,25±3,65**	0,68
		48h	8	11	7	7	9	13	17	11	4	9,87±4,05**	0,54
100	24h	8	15	21	16	10	18	6	10	13	13,62±4,86**	0,60	
	48h	8	9	9	12	8	15	11	14	7	10,62±2,87**	0,51	

<sup>a</sup> Controle negativo (0,1%), <sup>b</sup> Controle positivo (20mg/mL); <sup>c</sup> Tempo de sacrifício após o tratamento; <sup>d</sup> Os dados correspondem à média ± DP de três experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,01 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett

#### 4.6 Análise de Micronúcleo em Linfócitos Humanos

Após o tratamento dos linfócitos com ácido caurenóico, observou-se um aumento significativo no número de células binucleadas micronucleadas nas culturas tratadas com 30 e 60 µg/mL (p<0,01 e p<0,001, respectivamente). O agente alquilante metil-metano-sulfonado (MMS) foi utilizado como controle positivo na concentração de 4 x 10<sup>-5</sup> M (Figura 16).

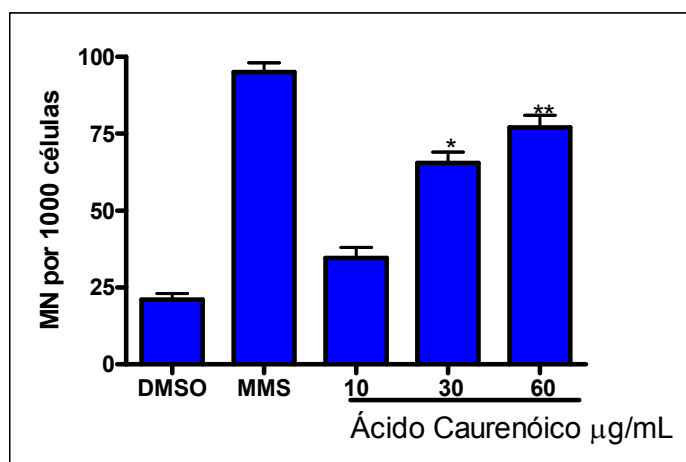


Figura 16 - Efeito do ácido caurenóico sobre a incidência de micronúcleos em linfócitos humanos. O veículo utilizado para diluir a droga, DMSO (0,1%), foi utilizado como controle negativo e o agente alquilante metilmetano-sulfonado (MMS) a  $4 \times 10^{-5}$  M foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Tukey

#### 4.7 Aberrações Cromossômicas

Os linfócitos tratados nas fases  $G_1$  e na fase de transição  $G_1/S$  com ácido caurenóico nas doses de 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram um aumento no número de células com aberrações cromossômicas ( $p < 0,001$ ) e uma redução significativa do índice mitótico ( $p < 0,05$ ) (IM). Porém, nenhuma evidência de citotoxicidade foi observada nas outras fases do ciclo e, do ponto de vista estatístico, o ácido caurenóico não foi genotóxico quando as células foram tratadas em S e  $G_2$  (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do ácido caurenóico sobre a proliferação e indução de aberrações cromossômicas nas diferentes fases do ciclo celular de linfócitos humanos

	Tratamento	IM (%) <sup>a</sup>	Número de Aberrações <sup>b</sup>											Células Aberrantes (%) <sup>f</sup>			
			Gaps			RUP <sup>c</sup>			POL <sup>d</sup>			ENDO <sup>e</sup>					
G <sub>1</sub>	DMSO	3.4 ± 0.3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	AC 10 µg/mL	1.4 ± 0.7*	1	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.4
	AC 30 µg/mL	0.8 ± 0.1*	3	0	1	4	2	4	1	0	0	1	0	0	0	0	2.5 ± 0.2**
	AC 60 µg/mL	0.3 ± 0.4*	1	0	0	9	5	7	3	1	1	0	0	0	0	0	3.1 ± 0.7**
	Doxorrubicina <sup>g</sup>	0.6 ± 0.1*	2	1	1	0	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	2.1 ± 0.1**
G <sub>1</sub> /S	DMSO	3.0 ± 0.6	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2 ± 0.0
	AC 10 µg/mL	1.9 ± 0.3*	2	1	1	0	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0.3 ± 0.1
	AC 30 µg/mL	1.1 ± 0.2*	1	0	0	3	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	2.2 ± 0.3**
	AC 60 µg/mL	0.5 ± 0.1*	5	1	4	7	9	5	2	0	0	0	1	1	0	0	2.9 ± 0.1**
	Doxorrubicina	0.7 ± 0.2*	5	2	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1.9 ± 0.3**
S (1hour)	DMSO	3.2 ± 0.8	0	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0.2 ± 0.1
	AC 10 µg/mL	3.0 ± 0.6	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2 ± 0.1
	AC 30 µg/mL	2.7 ± 0.2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.4
	AC 60 µg/mL	2.2 ± 0.1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.2
	Doxorrubicina	0.8 ± 0.1*	0	1	1	3	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1.5* ± 0.3
S (6 hours)	DMSO	3.1 ± 0.4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	AC 10 µg/mL	2.5 ± 0.1	1	2	1	0	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.4
	AC 30 µg/mL	2.1 ± 0.3	1	0	2	1	1	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0.4 ± 0.1
	AC 60 µg/mL	1.8 ± 0.3	2	0	0	3	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.7 ± 0.3
	Doxorrubicina	0.5 ± 0.3*	3	2	0	3	2	2	4	2	0	3	1	1	0	0	1.7 ± 0.1**
G <sub>2</sub>	DMSO	3.5 ± 0.5	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2 ± 0.0
	AC 10 µg/mL	2.9 ± 0.5	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0.3 ± 0.1
	AC 30 µg/mL	2.2 ± 0.1	2	1	2	0	0	1	4	1	1	1	1	0	0	0	0.7 ± 0.3
	AC 60 µg/mL	1.7 ± 0.3	3	0	0	1	1	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.1
	Doxorrubicina	0.5 ± 0.3*	4	1	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1.4* ± 0.5

<sup>a</sup>Índice mitótico; <sup>b</sup>Número de aberrações em 100 metáfases analisadas; <sup>c</sup>rupturas na cromatina dos cromossomos (quebras cromatídicas ou cromossômicas); <sup>d</sup>Células poliplóides; <sup>e</sup>Endoduplicação; <sup>f</sup>Frequência de células aberrantes. DMSO (0,1%) foi utilizado como controle negativo e a doxorubicina (0,3µg/mL) serviu como controle positivo. Os dados correspondem à média ± DP de três experimentos independentes. \*p<0,05 e \*\*p<0,001 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste t de Student

#### 4.8 Atividade Mutagênica do Ácido Caurenóico em *S. cerevisiae*

##### 4.8.1 Efeito Citotóxico

As células de levedura foram tratadas com ácido caurenóico em condições de crescimento em meio completo (YPD) e em condições de não crescimento em PBS. O efeito



citotóxico induzido pelo ácido caurenóico foi observado em todas as culturas de *S. cerevisiae*, independente das condições de crescimento. A citotoxicidade foi mais acentuada em culturas de leveduras em fase de crescimento exponencial em meio YPD. Além disso, foi observada uma elevada toxicidade em leveduras, em fase exponencial de crescimento cultivadas em PBS. E uma citotoxicidade moderada em células em fase de crescimento estacionário cultivadas em PBS. A ação citotóxica do ácido caurenóico foi independente do estágio metabólico da levedura (Tabelas 4 e 5).

#### 4.8.2 Efeito Mutagênico

A ação mutagênica do ácido caurenóico foi observada tanto em culturas cultivadas em condições de crescimento (YPD) como naquelas cultivadas em condições de não crescimento (PBS). O ácido caurenóico induziu um aumento nas frequências de mutações pontuais ( $HIS1^+$ ,  $LYS1^+$ ) e mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ( $HOM3^+$ ) durante a fase exponencial de crescimento em leveduras cultivadas em YPD na presença de altas concentrações de ácido caurenóico. Em condições de não crescimento, as frequências de mutações dos locis *his1* e *hom3* foram significativas apenas nas concentrações a partir de 0,5mg/mL, porém não foi observado aumento significativo na frequência de mutação para o locus *lys1* (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Reversão da mutação pontual para (*his1-7*), alelo ocre (*lys1-1*) e mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*hom3-10*) em linhagem haplóide XV185-14c de *S.cerevisiae* após tratamento com ácido caurenóico durante 18 horas em condições de não crescimento (PBS)

	Agente	Tratamento	Sobrevivência (%)	HIS1/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	LYS1/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>b</sup>	HOM3/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>
Fase Estacionária em PBS	4NQO <sup>d</sup>	0 µg/ml	100	3.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	8.3 ± 0.9 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>c</sup>
		0.5 µg/ml	62.0	118.0 ± 2.6***	48.9 ± 2.22***	24.0 ± 6.12***
	AC	0	100	3.0 ± 0.0	7.0 ± 0.5	1.5 ± 0.4
		0.1 mg/mL	91.5	5.1 ± 2.4	7.4 ± 0.1	2.2 ± 1.0
		0.25mg/mL	88.7	8.6 ± 0.9	6.8 ± 0.5	3.9 ± 1.9
		0.5 mg/mL	60.6	9.2 ± 1.7*	10.4 ± 2.3	4.2 ± 0.0**
		1 mg/mL	45.9	14.0 ± 3.9**	5.3 ± 0.6	6.6 ± 0.1**
2 mg/mL	30.8	22.0 ± 1.8**	6.8 ± 2.4	9.6 ± 0.3**		
Fase Exponencial em PBS	4NQO <sup>d</sup>	0 µg/ml	100	3.3 ± 1.9 <sup>c</sup>	8.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.4 <sup>c</sup>
		0.5 µg/ml	57.8	112.5 ± 10.0*	34.6 ± 2.1***	28.9 ± 0.3***
	AC	0	100	5.0 ± 0.4	9.8 ± 1.2	3.6 ± 0.6
		0.1 mg/mL	81.9	9.7 ± 2.7	7.3 ± 1.9	3.9 ± 0.5
		0.25mg/mL	63.2	7.3 ± 2.0	8.8 ± 0.1	4.2 ± 2.7
		0.5 mg/mL	45.4	9.0 ± 0.4*	9.1 ± 0.7	6.2 ± 0.6
		1 mg/mL	29.5	24.7 ± 0.5**	10.5 ± 0.3	7.8 ± 0.4
2 mg/mL	7.1	35.7 ± 6.5*	14.5 ± 2.3*	8.8 ± 0.6*		

<sup>a</sup> Revertentes locus específico; <sup>b</sup> revertentes locus não específico; <sup>c</sup> média ± DP de três experimentos independentes; <sup>d</sup> controle positivo (óxido de nitroquinolina); AC – ácido caurenóico; \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado com o controle negativo (DMSO) por ANOVA

Tabela 5 - Reversão da mutação pontual para (*his1-7*), alelo ocre (*lys1-1*) e mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*hom3-10*) em linhagem haplóide XV185-14c de *S.cerevisiae* após tratamento com ácido caurenóico em condições de crescimento

Agente	Tratamento	Sobrevivência (%)	HIS1/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	LYS1/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>b</sup>	HOM3/10 <sup>7</sup> sobreviventes <sup>a</sup>
4NQO <sup>d</sup>	0 µg/ml	100	13.3 ± 0.4 <sup>c</sup>	6.2 ± 1.5 <sup>c</sup>	4.8 ± 1.4 <sup>c</sup>
	0.5 µg/ml	61.2	191.3 ± 0.3 <sup>d***</sup>	64.9 ± 0.9 <sup>d***</sup>	40.2 ± 2.3 <sup>d***</sup>
AC	0	100	15.0 ± 1.8	5.1 ± 1.9	6.0 ± 1.4
	0.1 mg/mL	64.2	18.3 ± 0.4	7.0 ± 0.2	9.7 ± 0.7
	0.25mg/mL	41.1	11.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1	12.8 ± 2.5*
	0.5 mg/mL	19.6	22.4 ± 0.6*	15.8 ± 2.4	18.1 ± 0.7**
	1 mg/mL	6.7	45.7 ± 4.6**	18.5 ± 4.3*	21.7 ± 3.1**
	2 mg/mL	0.5	74.1 ± 1.9***	19.5 ± 0.7*	34.6 ± 0.4**

<sup>a</sup> Revertentes locus específico; <sup>b</sup> revertentes locus não específico; <sup>c</sup> média ± DP de três experimentos independentes; <sup>d</sup> controle positivo (óxido de nitroquinolina); AC – ácido caurenóico; \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado com o controle negativo (DMSO) por ANOVA

## 5 DISCUSSÃO

As descobertas de substâncias ativas em plantas medicinais impulsionaram uma revolução científica e tecnológica e os medicamentos vegetais foram sendo substituídos por fármacos sintéticos (KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001). Nas últimas décadas, porém, tem-se verificado uma tendência mundial de aumento na demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico, influenciado por fatores econômicos, sociais e culturais (MAHADY, 2001; ABU-IRMAILEH; AFIFI, 2003; BENT; KO, 2004; De SMET, 2004). A maior industrialização e comercialização de medicamentos naturais tornou o seu uso um problema de saúde pública. O aumento na demanda associado à falta de fiscalização efetiva que garanta desde a exploração racional dos recursos naturais empregados como matéria-prima, até a dispensação do produto acabado, contribuem para a disponibilidade e acesso a produtos muitas vezes sem condições adequadas ao uso, sem garantia de qualidade, segurança e eficácia, fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor (CALIXTO, 2000; ELVIN-LEWIS, 2001; CHAN, 2003; GIVEON *et al.*, 2004).

Dentre as 250 mil espécies vegetais estimadas no planeta, apenas uma pequena porcentagem foi estudada quanto a sua composição micromolecular. Quando se considera o número de plantas submetidas a ensaios biológicos ou farmacológicos, esse percentual é ainda menor (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; RATES, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003). Estima-se que cerca de 5 a 15% do total de plantas superiores já tenham sido avaliadas na busca de substâncias biologicamente ativas (SOERJATO, 1996), sendo que, no Brasil, esse percentual é muito menor (OLIVEIRA; BRAGA, 2003).

No Brasil, o uso de plantas medicinais vem crescendo nas últimas décadas. Apenas 20% da população brasileira é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis. O restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES, 2000). Entretanto, existe pouca informação quanto ao seu potencial de risco à saúde. Em países desenvolvidos, as drogas vegetais são testadas e avaliadas seguindo-se normas e critérios similares àqueles estabelecidos para medicamentos sintéticos. No entanto, há pouca informação sobre a genotoxicidade de drogas vegetais (MOREIRA *et al.*, 2002).

Em geral, as espécies do gênero *Copaifera* são importantes econômica e medicinalmente. Essas espécies são particularmente conhecidas devido à produção de um óleo resinoso extraído de seu caule (óleo de copaíba) detentoras de um amplo espectro de propriedades medicinais (ALMEIDA *et al.*, 1998; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; LIMA *et al.*, 2003). O interesse pela química desse gênero evoluiu bastante ao longo dos anos, devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies desse gênero têm sido bem investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico (GRAMOSA *et al.*, 1996; MAÍSTRO *et al.*, 2005). Nos estudos fitoquímicos realizados com o óleo-resina das espécies do gênero *Copaifera*, verificou-se a presença de várias classes de metabólitos secundários. Dentre esses, os diterpenos tetracíclicos da série caurano, como os ácidos caurenóico e cauranóico, e clerodanos como o ácido *hardwickiico*, os quais são compostos farmacologicamente ativos (OHSAKI *et al.*, 1994; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2003).

Alguns gêneros de plantas destacam-se pelos elevados teores de diterpenos caurânicos, como *Copaifera*, *Xylopi*a, *Annona* e *Mikania* spp. (OLIVEIRA; BRAGA, 2003). O presente trabalho avaliou a atividade genotóxica *in vitro* do ácido caurenóico isolado de *Copaifera langsdorffii* em dois tipos celulares sanguíneos: linfócitos humanos e células leucêmicas (HL60) humanas. Assim como, o potencial genotóxico *in vivo* em células da medula óssea de camundongos. Também foi avaliado o efeito mutagênico do ácido caurenóico em modelo experimental com *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, foi avaliado o possível mecanismo de ação pelo qual o ácido caurenóico exerce seu efeito genotóxico e mutagênico.

A exclusão por azul de tripan é um ensaio de viabilidade celular que quantifica as células capazes de drenar o corante ácido azul de tripan para fora da célula em contraposição àquelas que não possuem essa capacidade. A absorção desse corante é um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular (HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.*, 2004).

O ácido caurenóico induziu, nas maiores concentrações, uma redução no número de células viáveis, tanto para linfócitos como para células leucêmicas, após 4 horas de exposição. O mesmo efeito, embora mais acentuado, foi observado nas células expostas a droga durante 24 horas, em todas as concentrações. Em ambos os tratamentos, a redução do número de células viáveis foi acompanhada pelo aumento do número de células não viáveis. Os danos à membrana celular induzidos pelo ácido caurenóico

foram similares para as duas linhagens celulares utilizadas. A redução da viabilidade celular pode ser explicada, em parte, pelo potencial hemolítico do ácido caurenóico sobre eritrócitos humanos e de camundongos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2002). Já que algumas substâncias isoladas de plantas como polifenóis, epicatequinas, glicosídeos, saponinas, terpenos e outros podem causar alterações na membrana de eritrócitos e induzir hemólise (AKI;YAMAMOTO, 1991).

Entretanto, a morte celular é um fenômeno essencial na homeostase do organismo e sua ocorrência tem sido documentada durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário. Esta não é apenas importante para o desenvolvimento normal, mas também para a vida adulta de muitos organismos vivos (GERCHENSON; ROTELLO, 1992; WEIL *et al.*, 1996). Desse modo, a redução da viabilidade celular pode ter sido, também, em decorrência da indução da apoptose ou necrose.

Apoptose é definida por alterações morfológicas incluindo diminuição do volume celular, perda de contato, condensação da cromatina, expulsão de vesículas, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (NAKAMURA *et al.*, 2002; KUMMAR *et al.*, 2005). O processo apoptótico induz morte celular de forma altamente regulada que elimina células ou tecidos indesejados, protegendo o organismo contra a formação de neoplasmas. O mecanismo defeituoso de apoptose pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (OPALKA *et al.*, 2002).

Enquanto, necrose tem sido considerada um processo de degeneração completamente diferente da apoptose. Entretanto, tem sido demonstrado que a magnitude da injúria inicial e a variação do tipo de estímulo decidirão se a morte celular será por meios apoptóticos ou necróticos (HETTS, 1998). A necrose ocorre por uma ação rápida da droga na célula e é caracterizada pelo aumento do volume celular inicial e perda da integridade da membrana plasmática (DARZYNKIRWICZ *et al.*, 1992), sendo freqüentemente atribuída a diversas perturbações metabólicas ou mesmo oriunda de injúrias mecânicas, onde há uma rápida desestabilização da membrana plasmática, sendo relacionada com a resposta inflamatória sem atentar à sua função fisiológica.

Drogas que induzem morte celular por apoptose em linhagens de células tumorais podem ser úteis na quimioterapia (ZAMAI *et al.* 2001; BRADY, 2004). Dessa maneira, o ácido caurenóico, como observado pela coloração por BE/AL, induziu apoptose e necrose, tanto em linfócitos como em células leucêmicas, de modo dose dependente. Esses resultados corroboram com os achados previamente reportados sobre

os efeitos pró-apoptóticos de diterpenos caurânicos nas células leucêmicas da linhagem HL60 (NAGASHIMA *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004; KONDOH *et al.*, 2005b).

Em geral, o desencadeamento do processo apoptótico envolve a ativação de uma família de enzimas composta, pelo menos, de 14 proteases diferentes conhecidas como caspases. As caspases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases). A clivagem e ativação das pró-caspases podem ocorrer devido a uma série de estimulações incluindo os danos induzidos ao DNA. Kondoh *et al.* (2004, 2005a) estudaram os mecanismos de apoptose de alguns diterpenos caurânicos na linhagem leucêmica HL60 e concluíram que eles induzem apoptose em células leucêmicas mediante ativação da caspase-8. Assim, a falta de seletividade do ácido caurenóico e a indução de apoptose em linfócitos humanos sugere que as vias de ativação dos processos apoptóticos em linfócitos, poderão ser mediadas via ativação de caspase-8.

As topoisomerases são enzimas celulares essenciais para a manutenção da estrutura do DNA. Atuando no relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a transcrição, replicação e divisão celular (mitose/meiose). Essas enzimas atuam através da quebra e religação seqüenciais de uma fita (topoisomerase I) ou das duas fitas do DNA (topoisomerase II) (GODARD *et al.*, 2002; SOE *et al.*, 2006).

Vários agentes químicos capazes de atuar como inibidores enzimáticos têm demonstrado respostas efetivas no tratamento do câncer – particularmente aquelas substâncias que inibem a atuação da enzima topoisomerase I. Os compostos capazes de inibir a ação da topoisomerase I podem ser divididos em dois grupos: os que agem diretamente sobre a enzima e os que impedem a ligação da enzima ao DNA (supressores de topoisomerase I). Até o presente momento, não existe evidências claras demonstrando que os supressores de topoisomerase I são específicos para esta enzima (Da SILVA *et al.*, 2003).

Foi observado uma inibição do relaxamento do DNA após a eletroforese. Essa inibição do relaxamento do DNA mostrou ser dependente de concentração. Uma vez que a quantidade de DNA que migrou durante a eletroforese foi maior em baixa concentração e muito menor na concentração mais alta de ácido caurenóico. Na tentativa de obter informações sobre como a ação da topoisomerase I pode ser inibida pelo ácido caurenóico, a concentração de DNA foi dobrada. O aumento da quantidade de substrato no sistema de teste foi acompanhado pelo aumento da quantidade de DNA relaxado em virtude da ação da topoisomerase I. Esses dados sugerem que o ácido

caurenóico parece não interagir diretamente com a enzima, mas, sim, com o DNA, uma vez que, o efeito da enzima foi recuperado.

Vale ressaltar que, para diterpenos caurânicos não foi encontrada nenhuma referência na literatura a respeito da atividade sobre a inibição da ação da topoisomerasas. Porém, Mizushina *et al.* (2005) demonstrou que diterpenos tetracíclicos são capazes de inibir a atividade da ação topoisomerasas sobre o DNA.

Agentes intercalantes como os corantes de acridina e a quinacrina, bem como os agentes anti-neoplásicos, podem induzir aberrações cromossômicas e quebras de fitas no DNA de células de mamíferos (De MARINI; LAURENCE, 1992; SUZUKI *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 1998; PALITTI, 1998; HAMMONDS *et al.*, 2000; SORTIBRÁN *et al.*, 2006). O anti-neoplásico camptotecina, inibidor específico para a topoisomerase I, induz altas frequências de aberrações cromossômicas e processos mutacionais como a deleção de alguns genes (HASHIMOTO *et al.*, 1995; PINERO *et al.*, 1996). O etoposide, inibidor seletivo para topoisomerase II, induz a formação de micronúcleos em células meióticas de ratos e em células da medula óssea de camundongos (LAHDETIE *et al.*, 1994; BOOS; STOPPER., 2000; TURNER *et al.*, 2001).

As mutações podem ocorrer em três níveis: gênica, cromossômica e mutações genômicas, como a mudança no número de cromossomos originando as aneuploidias e poliploidias. Um único método de genotoxicidade não pode fornecer informações sobre todos os indicadores de toxicidade genética. Consequentemente, é necessário que cada agente químico seja avaliado em diferentes ensaios para que se possa colher informações adequadas a respeito de seu potencial genotóxico. Em geral, apenas dois ensaios *in vitro*, um a nível gênico em bactérias e o outro a nível cromossômico em células de mamífero, são considerados necessários em caso de agentes químicos cuja exposição ao homem seja limitada ou nula. No caso de agentes químicos cuja exposição ao ser humano seja direta (aditivos alimentares e farmacêuticos, por exemplo), um ensaio *in vivo* se torna necessário e complementar aos outros ensaios referidos acima (CARERE *et al.*, 2002; DEARFIELD *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2003).

O teste do cometa não tem por finalidade detectar mutações a nível gênico, mas pode ser aplicado ao estudo de lesões genômicas. Estas lesões, a depender de sua natureza, podem ser reparadas mediante expressão de vários genes envolvidos nos mais variados mecanismos de reparo do DNA (SLUPPHAUG *et al.*, 2003).



De acordo com a análise dos resultados do ensaio do cometa, o ácido caurenóico, em altas concentrações, induziu danos no DNA de linfócitos e HL60 nos dois tempos de exposição (4 e 24 horas) na mesma magnitude. Não houve diferença entre as células tratadas no mesmo período de exposição. Porém, as culturas tratadas com ácido caurenóico durante 24 horas apresentaram maiores valores de índice de dano (ID). Em relação à citotoxicidade, Hartmann e Speit (1997) reportaram que a ocorrência de cometas sem cabeça e com quase todo o DNA presente na cauda (cometas da classe 4) após a eletroforese é uma provável indicação de efeito citotóxico. A ocorrência de cometas da classe 4 tem sido descrita como o aspecto mais indicativo de células apoptóticas dentro dos parâmetros do teste do cometa. A fragmentação de DNA durante a apoptose é caracterizada pela geração de quebras de fitas-dupla do DNA, o que resultará em uma maior quantidade de DNA que irá migrar para a cauda do cometa durante a eletroforese (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; HARTMANN; SPEIT, 1997). Esses achados reforçam os dados encontrados recentemente por Cavalcanti *et al.*, (2006) em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (linhagem V79) tratados com ácido caurenóico. Os dados obtidos sobre a indução de apoptose através da coloração por BE/AL corroboram com os achados do ensaio do cometa. No qual o aumento das concentrações de ácido caurenóico e do tempo de exposição, resulta no aumento do número de células apoptóticas e dos valores de ID para ambas as linhagens testadas.

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro importante quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica do composto. Muitas drogas citotóxicas não tendem a serem seletivas em suas ações, agindo e danificando as células saudáveis (ANAZETTI *et al.*, 2003). O ácido caurenóico induziu danos ao DNA tanto em células normais (linfócitos) como em células leucêmicas (HL60) na mesma magnitude.

Diante desses dados, as lesões induzidas no DNA dos linfócitos foram avaliadas quanto ao seu potencial de reparação pela própria maquinaria celular. Em nosso estudo, os linfócitos foram tratados com ácido caurenóico durante a fase G<sub>0</sub> (quiescência), sem estímulo mitogênico. Após o tratamento e a remoção da droga das culturas, fitohemaglutinina foi adicionada para estimular a proliferação celular. Alguns estudos têm estabelecido que linfócitos em proliferação são capazes de reparar as lesões no DNA mais rapidamente do que linfócitos quiescentes (baixo metabolismo), indicando que o número de enzimas envolvidas no reparo de lesões no DNA são maiores em linfócitos em divisão (KAMINSKAS; LI, 1992). Os parâmetros utilizados para avaliar a

cinética de reparo das lesões, índice e frequência de dano (ID e FD), mostraram que as lesões começaram a ser reparadas nas primeiras horas após a remoção da droga nas culturas. Após 48 horas, mais de 80 % das lesões haviam sido reparadas. Mas nada podemos afirmar sobre a fidedignidade do reparo dessas lesões.

Boerrigter *et al.* (1991) demonstrou que a estimulação mitogênica de linfócitos pode resultar em um aumento da taxa de remoção de lesões específicas no DNA. Essa observação pode ser explicada pela regulação do ciclo celular dependente de enzimas específicas de reparo de lesões no DNA (SIROVER, 1990). A rápida redução dos valores de ID após o tempo de reparo estipulado, nos permite afirmar que a grande maioria das lesões presentes no DNA dos linfócitos tratados com ácido caurenóico podem ser quebras de fita simples. A indução de apoptose e necrose em células tratadas com ácido caurenóico analisados através da coloração por BE/AL e a presença significativa de cometas da classe 4 (dano máximo) no ensaio do cometa, sugere a presença de quebras de fitas duplas no DNA, porém numa menor ocorrência.

As quebras de fita dupla representam umas das mais severas lesões ao DNA, devido a perda da continuidade cromossômica. Levando a geração de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômero) comprometendo a segregação cromossômica durante a mitose (KAYE *et al.*, 2004). Adicionalmente, lesões de fita dupla tendem a ser reparadas erroneamente devido a falta de segmentos complementares de DNA (molde) que possam ser utilizados pelas enzimas envolvidas no processo (PFEIFFER *et al.*, 2000).

O ácido caurenóico induziu a formação de micronúcleos *in vitro* em linfócitos humanos e em EPC de camundongos. A ocorrência de micronúcleos foi observada tanto no grupo de animais sacrificados 24 horas como no de 48 horas após o tratamento. Porém, foi observada uma menor incidência de EPC micronucleados no grupo sacrificado tardiamente. Segundo Mavournin *et al.* (1990) a razão entre a frequência de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (ENC) decresce quando a substituição de EPC originados dos eritroblastos é diminuída. Portanto, a diminuição da relação EPC/ENC pode revelar a citotoxicidade do composto no ensaio. A frequência de micronúcleos em linfócitos está de acordo com os achados de Cavalcanti *et al.* (2006) em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (linhagem V79) em concentrações similares.

Poucos estudos de mutagenicidade foram realizados com óleo de copaíba. Sena e Chen (2002) demonstraram que a administração oral em camundongos do óleo-resina

de copaíba extraído de *C. langsdorffii*, induziu efeitos mutagênicos somente em altas doses (25%, 50% e 80% da  $DL_{50}$ ). Contudo, o óleo-resina extraído de *C. duckei*, segundo Maistro *et al.* (2005), apresentou atividade citotóxica contra células da medula óssea, mas, do ponto de vista estatístico, não apresentou indícios de mutagenicidade em ratos Wistar em altas doses (10%, 25% e 50% da  $DL_{50}$ ).

Os testes citogenéticos são importantes para o monitoramento de agentes farmacêuticos. Muitas drogas mutagênicas são capazes de induzir aberrações cromossômicas (BRITO *et al.*, 1996). O índice mitótico (IM) representa a proporção de células em divisão. Uma redução nos valores de IM pode refletir a inibição da progressão do ciclo celular e/ou uma perda da capacidade proliferativa. Durante os testes de aberrações cromossômicas (*in vivo* e *in vitro*), o IM é muito importante no monitoramento da toxicidade celular (AMORIM *et al.*, 2000).

O ácido caurenóico reduziu significativamente o IM e aumentou o número de células aberrantes nas fases iniciais do ciclo celular ( $G_1$  e  $G_1/S$ ). Por outro lado, o tratamento não afetou a taxa de proliferação celular e a frequência de células aberrantes nas fases S e  $G_2$ . Esses achados sugerem que o ácido caurenóico é citotóxico para os linfócitos no momento em que eles são estimulados mitogenicamente. Durante o início do ciclo celular os linfócitos são mais sensíveis do que nas outras fases (LIMA *et al.*, 2003). As frequências dos diferentes tipos de aberrações observadas nas metáfases de linfócitos tratados nas fases S e  $G_2$  não foram significativas quando comparadas com as aberrações produzidas em  $G_1$  e na fase de transição  $G_1/S$ . Não foi observado aumento de células poliplóides em nenhuma fase do ciclo celular, o que indica, dentro das condições do teste, que o ácido caurenóico não interfere nas fibras do fuso mitótico. Zhang *et al.*, (2005) demonstrou que linfócitos tratados com alguns diterpenos caurânicos promovem aumento no número de células na fase  $G_1$  e, conseqüentemente, uma redução significativa na proporção de células nas fases S e  $G_2$ . Sugerindo que esses diterpenos inibem a replicação do DNA na fase de transição  $G_1/S$ . A toxicidade celular exercida pelo ácido caurenóico nas fases  $G_1$  e  $G_1/S$  pode estar relacionadas com a inibição da replicação do material genético.

Nos ensaios de mutagênese com *S. cerevisiae*, o efeito mutagênico do ácido caurenóico não parece estar relacionado com o estágio metabólico da levedura. Porém, o potencial citotóxico do ácido caurenóico foi mais pronunciado nas células tratadas durante a fase exponencial de crescimento. Dentre essas, a sensibilidade ao composto foi maior em células incubadas em meio de cultivo rico em nutrientes (YPD). O ácido

caurenóico é um diterpeno caurânico tetracíclico e sabe-se que diterpenos tetracíclicos são capazes de inibir a ação da topoisomerase sobre o DNA (MIZUSHINA *et al.*, 2005). É possível que a citotoxicidade do ácido caurenóico, em parte, esteja relacionada com esse tipo de interação com a molécula de DNA, uma vez que a citotoxicidade elevada só foi observada durante a fase exponencial de crescimento. Onde, devido a replicação do DNA, este se torna mais acessível à droga.

O ácido caurenóico gerou mutações pontuais lócus específicas e de deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) tanto na fase estacionária como na exponencial de crescimento. Mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura induzidas por drogas intercalantes de DNA têm sido correlacionadas com as quebras de fitas de cadeia de DNA induzidas pela inibição de topoisomerases (SUNG *et al.*, 2000).

Em todos os ensaios, o ácido caurenóico exerceu efeitos mutagênicos em leveduras. Porém, não foi possível sugerir uma correlação de concentração entre os ensaios com levedura e os outros ensaios de genotoxicidade realizados nesse estudo.

Uma vez que, nem todo agente genotóxico é, necessariamente, mutagênico, pelo fato das lesões geradas no DNA poderem ser reparadas ou evoluírem para mutações. O ensaio de mutagênese em levedura nos permite estudar as mutações e, assim, propor a natureza do dano ao DNA induzidos. O ácido caurenóico foi genotóxico em células V79 induzindo quebras no DNA e a formação de micronúcleos (CAVALCANTI *et al.*, 2006) e em linfócitos humanos. O aumento na frequência de mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura e a inibição da ação da topoisomerase I pelo ácido caurenóico, sugere que as quebras de fitas no DNA podem ser originadas através de um efeito intercalante do ácido caurenóico no DNA. A não observação de células poliplóides após o tratamento com o ácido caurenóico, sugere que os micronúcleos presentes tanto em linfócitos como em EPC são resultantes do efeito clastogênico do ácido caurenóico e não de sua atuação sobre o aparelho mitótico celular (efeito aneugênico). A ocorrência de micronúcleos em ensaios *in vitro* e *in vivo* nos permite afirmar que o ácido caurenóico é um composto que não precisa ser metabolizado para exercer seus efeitos tóxicos e mutagênicos.

## 6 CONCLUSÃO

O ácido caurenóico, um diterpeno caurânico tetracíclico isolado de *C. langsdorffii*, não mostrou seletividade entre linfócitos e células leucêmicas (HL60) e induziu efeitos genotóxico e mutagênico em sistemas *in vitro* e *in vivo*. O ácido caurenóico não interfere sobre o aparelho mitótico celular, sendo os micronúcleos originados de fragmentos cromossômicos acêntricos. Seu mecanismo de toxicidade parece estar relacionado com a inibição da replicação do DNA devido ao intercalamento da molécula no material genético.

## REFERÊNCIAS

- ABU-IRMAILEH, B.E.; AFIFI, F.U. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 193-197, 2003.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 133-138, 1991.
- ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPS – International Programme on Chemical Safety: guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.
- AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURTSON, W.E. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 70, p. 782-786, 1973.
- AMORIM, M.I.M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.M.; MIRANDA, D.C.; LEVEL, J.; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl-mercury contamination in the Brazilian Amazon. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 72, p. 487-507, 2000.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.
- ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; CECCHI, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; TAKANASHI, C.S. Chromosome damage induced by DNA topoisomerase II inhibitors combined with  $\gamma$ -radiation *in vitro*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, p. 407-413, 1998.
- ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; KRONKA, S.N.; TAKAHASHI, C.S. Effects of tumeric and its activitie principle, curcumin, on bleomycin-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, p. 407-413, 1999.
- ATKIN, A.L.; RIAZI, M.A.; GREER, C.L.; ROY, K.L.; BELL, J.B. The functional analysis of nonsense suppressors derived from *in vitro* engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. **Genes**, v. 134, p. 57-65, 1993.
- AU, W.W.; BADARY, O.A.; HEO, M.Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occup. Med.**, v. 16, p. 345-357, 2001.
- AYDEMIR, N.; ÇELIKLER, S.; BILALOGLU, R. *In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 582, p. 35-41, 2005.

- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARROS, M.E.; SCHOR, N.; BOIM, M.A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. **Urol Res.**, v. 30, p. 374-379, 2003.
- BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A.B. Trypanosomicidal kaurenes diterpenes from *Widelia paludosa*. **Planta Med.**, v. 65, p. 283-284, 1999.
- BAUMGARTNER, A.; SCHMID, T.E.; CEMELI, E.; ANDERSON, D. Parallel evaluation of doxorubicin-induced genetic damage in human lymphocytes and sperm using the comet assay and spectral karyotyping. **Mutagenesis**, v. 19, p. 313-318, 2004.
- BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **Am. J. Med.**, v. 116, p. 478-485, 2004.
- BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N.I.; AYMIM, J.S. Anti-microbial properties of some west African medicinal plants iv. Anti-microbial activity of xilopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Llyodia**, v. 40, p. 543-545, 1977.
- BOEIRA, J.M.; VIANA, A. F.; PICADA, J.N.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two  $\beta$ -carbolide alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 500, p. 39-48, 2002.
- BOERRIGTER, M.E.; MULLAART, E.; VIJG, J. Induction and disappearance of DNA strand breaks in human peripheral lymphocytes and fibroblasts treated with methylmethanesulfonate. **Exp. Cell. Res.**, v. 192, p. 61-66, 1991.
- BOOS, G.; STOPPER, H. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. **Toxicol. Lett.**, v. 116, p. 7-16, 2000.
- BRADY, H.J.M. **Apoptosis methods and protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará**. Fortaleza: Centro de Divulgação Universitária, Imprensa Oficial, 1953.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará**. Mossoró: ed. Mossoroense, 1976.
- BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutat. Res.**, v. 612, p. 115-149, 2006.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay : use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.
- BRITO, A.R.M.S. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries? **J. Ethnopharmacol.**, v. 54, p. 131-138, 1996.
- BURIM, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J.L.C.; TAKAHASHI, C.S. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, p. 401-406, 1999.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. Methods in yeast genetics. In: Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual. [S.l.]: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 2000.

BURRIL, W.; LEVINE, E.L.; HINDOCHA, P.; ROBERTS, S.A.; SCOTT, D. Technical report: the use of cryopreserved lymphocytes in assessing inter-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 76, p. 375-382, 2000.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell culture**. [S.l.]: Blackwell Scientific Publications, 1992.  
CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS-BEDOLLA, P.; CAMPOS, M.G.; VALENCIA-SANCHES, A.; PRONCE-MONTER, H. Effect of kaurenes from *Montanoa* spp. on rat uterus. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 11-16, 1997.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, supl. 1, p. S58-S65, 2000.

CARERE, A.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. **Toxicol. Lett.**, v. 127, p. 153-160, 2002.

CARTER, S.B. Effects of cytochalasin on mammalian cells. **Nature**, v. 213, p. 261-264, 1967.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, B. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 946-950, 2005.

CARVALHO, P.E. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA\_SPI, 1994.

CASCON, V.; FERMANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; GIBALDI, D.; GILBERT, B.; RIBEIRO-SANTOS, R. Avaliação da composição química e da atividade tripanosomicida *in vitro* de óleo-resinas de *Copaifera* spp. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia, São Paulo. **Resumos do...Águas de Lindóia, SP: [s.n.], 1998. p. 199.**

CASCON, V.; ARAÚJO, G.L.; ROCHA, L.M.; TEIXEIRA, L.A.; CARVALHO, E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo-resinas de *Copaifera* spp. In: SIMPÓSIO DE PLANTA MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife, Pernambuco. **Resumos do...Recife, PE: [s.n.], 2000. p.223.**

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 388-392, 2006.



CHACON, D.R.; CINTRA, D.E.C.; CARVALHO, J.C.T.; OLIVEIRA, G.A.; MAISTRO, E.L. Absence of genotoxic and anti-genotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wistar rats. **Cytologia**, v. 67, p. 417-422, 2002.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, p. 1361-1371, 2003.

CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Semin. Integr. Med.**, v. 1, p. 53-62, 2003.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment** (CHOY, W.N. ed.). New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

CLARE, M.G.; LOREZON, G.; AKHURST, L.C.; MARZIN, D.; DELFT, J.; MONTERO, R.; BOTTA, A.; BERTENS, A.; CINELLI, S.; THYBAUD, V.; LORGE, E. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test II. Using human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 607, p. 37-60, 2006.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, v. 375, p. 183-193, 1997a.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CORDEL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

COSTA, V.; FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol. Aspects Med.**, v. 22, p. 217-246, 2001.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Invest. Drugs**, v. 9, p. 1-15, 2000.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over the periods 1981 – 2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: ed. Alcance, 2003. 422 p.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DAVINO, S.C.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivate substituted on carbon-15. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p.1127-1129, 1989.

De MARINI, D.M.; LAWRENCE, B.K. Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: role and DNA breaks. **Mutat. Res.**, v. 267, p. 1-17, 1992.

De MELO, A.C.; COSTA, B.B., De OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. HPLC quantitation of kaurene diterpenes in *Xylopi* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 40-45, 2001.

De MIRANDA, F.G.; VILAR, J.C.; ALVES, I.A.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellaneda* Lor. **Pharmacol.**, v. 1, p. 6-11, 2004.

De SMET, P.A.G.M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 76, p. 1-17, 2004.

De WINDE, J.H.; THEVELEIN, J.M.; WINDERICK, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: MAGER, W.H. (Ed.). **Yeast stress responses**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p. 7-52.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxic risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.**, v. 521, p. 121-135, 2002.

Del NUNZIO, M.J. Óleo de copaíba e seu emprego cosmético. **Aerosol Cosmet.**, v. 7, p. 7-9, 1995.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Extracts of Bolivian plants, *Copaifera reticulata* and *Heisteria pallida* inhibit *in vitro* free radical-mediated DNA damage. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 460-462, 1998.

DUTHIE, S.J.; MCMILLAN, P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1709-1714, 1997.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBELB, B.; BAKER, V.; BALLS, M., BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A., KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C., PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 193-236, 2002.  
ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies? **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 141-164, 2001.

FARNSWORTH, N.R. Medicinal plants in therapy. **Bull. WHO**, v. 63, p. 965-981, 1985.  
FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; BOEDECKER, R.H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat. Res.**, v. 566, p. 209-229, 2004.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 223-246, 1985a.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. Humn project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. **Mutat. Res.**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A. Copalic acid analgesic activity in mice. In: SIMPÓSIO BRASIL-CHINA DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS, 1989, Rio de Janeiro. **Resumos...**Rio de Jaeiro:[s.n.], 1989. p. 248.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Rev. Bras. Farm.**, v. 73, p. 53-56, 1992.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA-MACHADO, S.C.; RODRIGUES, M.P.; NUNES, A.P.M.; DANTAS, F.J.S.; MATTOS, J.C.P.; SILVA, C.R.; MOURA, E.G.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-ARAÚJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicol. Lett.**, v.151, p. 481-487, 2004.

FONSECA, C.A.; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Rev. Pharm. Bras.**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2004.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and Mutagenesis**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995.

FUGE, E.K.; WENER, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces sereviseae*. In: HOHMANN, S.; MAYER, W.H. (Ed.). **Yeast stress response**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p. 53-74.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Res.**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GEE, P.; MARON, D.M.; AMES, B.N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specif *Salmonella* tester strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 11606-11610, 1994.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p. 696-700, 2003.

GERCHENSON, M.A.; ROTELLO, R.J. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.**, v. 6, p. 2450-1455, 1992.

GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, p. 303-323, 1997.

GILBERT, B.; MORS, W.B.; BAKER, B.M.; TOMASSINI, T.C.B.; GOULART, E.G.; HOLANDA, J.C.; COSTA, J.A.R.; LOPES, J.N.G.; SANTOS-FILHO, D.; SARTI, S.J.; TURCO, A.M.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.L.C.; THAMES, A.W.; PELLEGRINO, J.; KATZ, N. A atividade anti-helmíntica de óleos essenciais e de seus componentes químicos. **An. Acad. Bras. Cien.**, v. 44, p. 423-428, 1972.

GIMMLER-LUZ, M.C.; ANDRADE, H.H.R.; MARAFON-BAYER, A.T. Benzidine and diaminobenzidine-induced micronuclei in mice after intraperitoneal and oral single or multiple treatment. **Braz. J. Genet.**, v. 20, p. 405-409, 1997.

GIVEON, S.M.; LIBERMAN, N.; KLANG, S.; KAHAN, E. Are people who use "herbal drugs" aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? **Patient. Educ. Couns.**, v. 53, p. 11, 2004.

GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M.; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, v. 520, p. 47-56, 2002.

GRAMOSA, N.V.; BRIGIDO, C.L.; SILVEIRA, E.R. Contribuição ao conhecimento químico do óleo de copaíba do Ceará. In: ENCONTRO DE QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS INDUSTRIAIS DO NORTE-NORDESTE DO BRASIL, 7., 1996, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: [s.n.], 1996.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HAMMONDS, T.R.; FOSTER, S.R.; MAXWELL, A. Increased sensitivity to quinolone antibacterials can be engineered in human topoisomerase II $\alpha$  by selective mutagenesis. **J. Mol. Biol.**, v. 300, p. 481-491, 2000.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

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

HARTMANN, A.; SCHUMACHER, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; LOWE, P.; SUTER, W.; MUELLER, L. Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity. **Mutagenesis**, v. 19, p. 51-59, 2004.

HASHIMOTO, H.; CHATTERJEE, S.; BERGER, N.A. Mutagenic activity of topoisomerase I inhibitors. **Clin. Cancer Res.**, v. 1, p. 369-376, 1995.

- HEDDLE, J.A.A. A rapid *in vitro* test for chromosome damage. **Mutat. Res.** 18, 187-190, 1973.
- HEDDLE, J.A.A.; HUTE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutat. Res.**, v. 124, p. 61-118, 1983.
- HENRIQUES, J.A.P.; VALSA, J.O.; GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas, In: PINTO, S.O.C. (Ed.). **Genética molecular de microorganismos**. São Paulo: Manole, 1987.
- HETTS, S.W. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 279, p. 300-307, 1998.
- HOUTGRAAF, J.H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W.J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Revasc. Med.**, v. 7, p. 165-172, 2006.
- HYNES, J.; FLOYD, S.; SOINI, A.E.; O'CONNOR, R., PAPKOVSKY, D.B. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **J. Biomol. Screening**, v. 8, p. 264-272, 2003.
- JEFFREY, A.M.; WILLIAMS, G.M. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 207, p. S628-S635, 2005.
- KAMINSKAS, E.; LI, J.C. Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 274, p. 103-110, 1992.
- KATO, M.J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, p. 621-623, 2001.
- KAYE, J.A.; MELO, J.A.; CHEUNG, S.K.; VAZE, M.B.; HABER, J.E.; TOCZYSKI, D.P. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 2096-2106, 2004.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 137-148, 2002.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECODIER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 140/141, p. 63-74, 2003.
- KIRSCH-VOLEDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v. 540, p. 153-163, 2003.

KONDOH, M.; SUZUKI, I.; SATO, M.; NAGASHIMA, F.; SIMIZU, S.; HARADA, M.; FUJII, M.; OSADA, H.; ASAKAWA, Y.; WATANABE, Y. Kaurene diterpene induces apoptosis in human leukemia cells partly through a caspase-8-dependent pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 311, p. 115-122, 2004.

KONDOH, M.; SUZUKI, I.; HARADA, M.; NAGASHIMA, F.; FUJII, M.; ASAKAWA, Y.; WATANABE, Y. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during ent-11 alpha-hydroxy-16-kauren-15-one-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **Planta Med.**, v. 71, p. 275-277, 2005a.

KONDOH, M.; NAGASHIMA, F.; FUJII, M.; HARADA, M.; SUZUKI, I.; WATANABE, Y. Induction of apoptosis by new ent-kaurene-type diterpenoids isolated from the New Zeland liverwort *Jungermannia* species. **Planta Med.**, v. 71, p. 1005-1009, 2005b.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Patologia**: bases patológica das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Disponível em: <<http://www.ich.org/>>. Acesso em: 8 Nov. 2006.

LAHDETIE, J.; KEISKI, A.; SUUTARI, A.; TOPPARI, J. Etoposide (VP-16) is a potent inducer of micronuclei in male rat meiosis: spermatid micronucleus test and DNA flow cytometry after etoposide treatment. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 24, p. 192-202, 1994.

LI, A. P. A comprehensive approach for drug safety assessment. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 27-33, 2004.

LIMA, S. Óleo de copaíba: atividade antimicrobiana in vitro. **Anfarmag**, v. 9/10, p.1-2, 1995.

LIMA, S.R.M.; CASCON, V.; PEREIRA, N.A. Estudo dos efeitos do óleo-resina de copaíba sobre células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE), 13., 1998, Caxambu, Minas Gerais. **Resumo...Caxambu**: [s.n], 1998. p. 391-392.

LIMA, S.R.M.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1048-1053, 2003.

LOHMAN, P.H.M.; GENTILE, J.M.; GENTILE, G.; FERGUSON, L.R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. **Mutat. Res.**, v. 496, p. 1-4, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBROW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, v. 19, p. 109-119, 1999.

MaCGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MaCGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MAHADY, G.B. Global harmonization of herbal health claims. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1120S-1123S, 2001.

MAÍSTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; KAPLAN, M.A.C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genet. Mol. Biol.**, v. 28, p. 833-838, 2005.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MARUZZELLA, J.C.; SICURELLA, N.A. Antibacterial activity of essential oil vapors. **J. Am. Assoc.**, v. 49, p. 692-694, 1960.

MATTER, B.; SCHIMID, W. Treminon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 12, p. 417-425, 1971.

McGAHON, A.J.; MARTIN, S.M.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the cell line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Meth. Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.

McKELVEY-MARTIN, V. J.; HO, E.T.S.; MCKEOWN, S.R.; JOHNSTON, S.R.; MCCARTHY, P.J.; RAJAB, N.F.; DOWNES, C.S. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damage and repaired DNA sequences in individual cells. **Mutagenesis** 13, 1-8, 1998.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.

MIZUSHINA, Y.; AKIHISA, T.; UKIYA, M.; HAMASAKI, Y.; MURAKAMI-NAKAI, C.; KURIYAMA, I.; TAKEUCHI, T.; SUGAWARA, F.; YOSHIDA, H. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. **Life Sciences**, v. 77, p. 2127-2140, 2005.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1653-1656, 1996.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. **Arq. Bras. Fitomed. Cient.**, v. 1, p. 30-38, 2003.

MORALES-RAMÍREZ, P.; MIRANDA-PASSAYE, S.; CRUZ-VALLEJO, V. L.; VALLARINO-KELLY, T.; MENDIOLA-CRUZ, M.T. Kinetic of genotoxic expression in the pharmacodynamics of busulfan. **Arch. Med. Res.**, v. 37, p. 316-321, 2006.

MOREIRA, A.C.; MULLER, A.C.A.; PEREIRA-JÚNIOR, N.; DE SOUZA-ANTUNES, A.M. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information**, v. 28, p. 34-42, 2006.

MOREIRA, R.R.D.; SANTOS, L.E.; VARELLA, S.D.; VARANDA, E.A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 12, p. 11-19, 2002.

MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine oporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. **Mutat. Res.**, v. 260, p. 145-152, 1991.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MULLER, L.; BLAKEY, D.; DEARFIELD, K.L.; GALLAOWAY, S.; GUZZIE, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRKLAND, D.; NACGREGOR, J.T.; PARRY, J.M.; SCHECHTMAN, L.; SMITH, A.; TANAKA, N.; TWEATS, D.; YAMASAKI, H. Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results – report on initial activities of the IWGT Expert Group. **Mutat. Res.**, v. 540, p. 177-181, 2003.

NAGASHIMA, F.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; SIMIZU, S.; OSADA, H.; FUJII, M.; ASAKAVA, Y. Apoptosis-inducing properties of ent-kaurene-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncata*. **Planta Med.**, v. 69, p. 377-379, 2003.

NAKAMURA, Y.; KAWAKAMI, M.; YOSHIHIRO, M.A.; MIYOSHI, N.; OHIGASHI, H.; KAWAI, K.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. Involvement of mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, p. 8492-8499, 2002.

NATARJAN, A.T.; OBE, G. Screening of human populations for mutations induced by environmental pollutants: use of human lymphocyte system. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 4, p. 468-481, 1980.

NATARAJAN, A.T.; OBE, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens? **Mutat. Res.**, v. 167, p. 189-201, 1986.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 3-16, 2002.



NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2002.

NG, A.; TAYLOR, G.M.; EDEN, O.B. Genotoxicity of etoposide: greater susceptibility of MLL than other target genes. **Cancer Genet. Cytogen.**, v. 164, p. 164-167, 2006.

NORDENSON, I.; BECKMAN, L.; LIDÉN, S.; STJERNBERG, N. Chromosomal aberrations and cancer risk. **Hum. Herd.**, v. 34, p. 76-81, 1984.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 17-36, 2002.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. (OECD) **OECD guidelines for testing of chemicals**. Disponível em: <<http://www.oecd.org>>. Acesso em: 8 Nov. 2006.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; SHIGERU, I.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodone diterpenoid from the oleoresin of Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

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

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arq. Bras. Fitomed. Cient.**, v. 1, p. 49-58, 2003.

OPALKA, B.; DICKOPP, A.; KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 172, p. 126-132, 2002.

OPDYKE, D.L.J. Balsam copaiba. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 14, p. 687, 1976.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation –induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PAES-LEME, A.A.; MOTTA, E.S.; MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-ARAÚJO, A. Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 197-201, 2005.

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastro-protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 73-78, 1998.

PAIVA, L.A.F.; De ALENCAR CUNHA, K.M.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii*. **Phyther. Res.**, v. 16, p. 737-739, 2002.

- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vasc. Pharmacol.**, v. 39, p. 303-307, 2003.
- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; De SOUSA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 51-56, 2004.
- PALITTI, F. Mechanisms of origin of chromosomal aberrations. **Mutat. Res.**, v. 404, p. 133-137, 1998.
- PANIGRAHI, G.B.; RAO, A.R. Chromosome-breaking ability of arecoline, a major betel-nut alkaloid, in mouse bone-marrow cells *in vivo*. **Mutat. Res.**, v. 103, p. 197-204, 1982.
- PARRY, E.M.; PARRY, J.M. The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: VENITT, S.; PARRY, S.M. (Ed.). **Mutagenicity testing: a practical approach**. Washington DC: ORL Press, 1984.
- PAULA-RAMOS, A.L.L.; QUEROL, C.B.; MARQUES, E.K.; HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid intergerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. **Rev. Bras. Gen.**, v. 14, p. 897-912, 1991.
- PELLEGRINO, J. Protection against human Schistosome cercariae. **J. Exper. Parasitol.**, v. 21, p. 112-131, 1967.
- PESSOA, C.; VIEIRA, F.M.A.C.; LEMOS, T.G.; MORAES, M.O.; LIMA, P.D.L.; RABENHORST, S.H.B.; LEYVA, A.; BURBANO, R.R. Oncocalyxone A from *Auxema oncocalyx* lacks genotoxic activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. **Teratogen. Carcin. Mut.**, supl. 1, p. 215-220, 2003.
- PETROVICK, P.R. Normatização da indústria fitofarmacêutica. In: REUNIÓN DE COORDINACIÓN PARA EL DESARROLLO (CYTED), 1., 1996, Antigua, Guatemala. **Resumo...**Antigua, Guatemala: Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacêuticos (RIPROFITO), 1996. p. 91-93.
- PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 5, p. 289-302, 2000.
- PFUHLER, S.; WOLF, H.U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 27, p. 196-201, 1996.
- PIMENTEL, M.E.L.; MORAES, M.O.; MELO, G.S.; VIANA, G.S.B.; BECERRA, F.A.F. Estudo da toxicologia clínica do Elixir de Aroeira do Sertão – *Myracrodrum urudeuva* Fr. All. (Fitoterápico). In: CONGRESSO DA FESBE, 13., 1998, Caxambu, Minas Gerais. **Anais...**Caxambu:[s.n.], 1998. p. 133.
- PINERO, J.; LÓPEZ-BAENA, M.; ORTIZ, T.; CORTÉS, F. Sister chromatid exchange induced by DNA topoisomerases poisons in late replicating heterochromatin: influence of inhibition of replication and transcription. **Mutat. Res.**, v. 354, p. 195-201, 1996.

- PIO CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 2, 370-375.
- POLI, P.; BUSCHINI, A.; CÂNDI, A.; ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochromo P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutagenesis**, v. 14, p. 233-238, 1999.
- PRINGLE, J.R.; HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, life cycle and inheritance**. New York: Cold Spring Harbor, 1982. v. 11, p.57-69.
- RABELLO-GAY, M. N. Teste do micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. São Paulo: FCA, 1991.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicol.**, v. 39, 603-613, 2001.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ed. ULBRA, 2003.
- RIZZINI, C.T. **A flora do cerrado: análise florística das savanas centrais em simpósios sobre cerrado**. São Paulo: ed. USP, 1963.
- ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUNOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutat. Res.**, v. 585, p. 147-155, 2005.
- SÁNCHEZ-LAMAR, A.; FUENTES, J.L.; FONSECA, G.; CAPIRO, N.; FERRER, M.; ALONZO, A.; BALUJA, L.; COZZI, R.; De SALVIA, R.; FIORE, M.; LLAGOSTERA, M. Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using *in vitro* and *in vivo* assays. **Toxicol. Lett.**, v. 136, p. 87-96, 2002.
- SANTOS, S.J.; SINGH, N.P.; NATARAJAN, A.T. Fluorescence *in situ* hybridization with Comets. **Exp. Cell Res.**, v. 232, p. 407-411, 1997.
- SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemical selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 629-799, 2000.
- SCHIMID, W. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic cells. **Agents Actions**, v. 3, p. 77-85, 1973.
- SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum, 1976. v. 4, p. 31-43.

SCHULLER, R.C.; VON BORSTEL, R.C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. **Mutat. Res.**, v. 24, p. 17-23, 1974.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Copaíba: produtos potenciais da Amazônia**. Brasília, 1998.

SENA, M.A.; CHEN, L.C. Avaliação da mutagenicidade do óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon.) em eritrócitos da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 5, p. 37-40, 2002.

SHIBAMOTO, Y.; STREFFER, C.; FUHRMANN, C.; BUDACH, V. Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. **Radiat. Res.**, v. 128, p. 293-300, 1991.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: ed. UFRGS/UFSC, 2000. 821 p.

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

SIROVER, M. Cell cycle regulation of DNA repair enzymes and pathways. In: \_\_\_\_\_. **Transformation of human diploid fibroblasts**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 29-54.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat. Res.**, v. 531, p. 231-251, 2003.

SNOW, S. Absence of suppressible alleles at the his 1 locus of yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 164, p. 341-342, 1978.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutat. Res.**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SOE, K.; HARTUNG, S.; GROSSE, F. Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 349, p. 178-185, 2006.

SOERJATO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SORTIBRÁN, A.N.C.; TÉLLEZ, M.G.O.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R.R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of drosophila melanogaster. **Mutat. Res.**, v. 604, p. 83-90, 2006.

STEENKAMP, V.; GRIMMER, H.; SEMANO, M.; GULUMIAN, M. Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. **Mutat. Res.**, v. 581, p. 35-42, 2005.

SUNG, P.; TRUJILLO, K.M.; VAN KOMEN, S. Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 257-275, 2000.

SUZUKI, H.T.; IKEDA, T.; YAMAGISHI, T.; NAKAIKE, S.; NAKANE, S., OHSAWA, M. Efficient induction of chromosome-type aberrations by topoisomerase II inhibitors closely associated with stabilization of the cleavable complex in cultured fibroblastic cells. **Mutat. Res.**, v. 328, p. 151-161, 1995.

SUZUKI, I.; KONDOH, M.; HORADA, M.; KOIZUMI, N.; FUJII, M.; WATANABE, Y. An ent-kaurene diterpene enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells. **Planta Med.**, v. 70, p. 723-727, 2004.

TAYLOR, J.L.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; VAN GORP, U.; De KIMPE, N.; VAN STADEN, J.; VERSCHAEVE, L. Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 42, p. 144-154, 2003.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHWEWA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. **Environ. Pollut.**, v. 109, p. 43-52, 2000.

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

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMAMI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Med.**, v. 68, p. 808-812, 2002.

TOMLINSON, T.R.; AKERELE, O. **Medicinal plants**: their role in health and biodiversity. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1993.

TRAORE, F.; GASQUET, M.; LAGET, M.; GUIRAUD, H.; DI GREAGÓRIO, C.; AZAS, N.; DOUMBO, O.; TOMON-DAVID, P. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis*. **Phytother Res.**, v. 14, p. 608-611, 2000.

TRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; Da COSTA, F.B.; COUTINHO, S.T.; De OLIVEIRA, D.C.R.; De OLIVEIRA, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 492, p. 233-241, 2004.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chem.**, v. 100, p. 81-90, 2007.

TURNER, S.D.; WIJNHOFEN, S.W.; TINWELL, H.; LASHFORD, L.S.; RAFFERTY, J.A.; ASHBY, J.; VRIELING, H.; FAIRBAIRN, L.J. Assays to predict the genotoxicity of the chromosomal mutagen etoposide – focusing on the best assay. **Mutat. Res.**, v. 493, p. 139-147, 2001.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz. J. Pharmac. Sci.**, v. 42, p. 289-306, 2006.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on 20-year survey. **Mutat. Res.**, v. 491, p. 119-126, 2001.

VARANDA, E.A.; RADDI, M.S.G.; DIAS, F.L.; ARAÚJO, M.C.P.; GIGRAN, S.C.A.; TAKAHASHI, C.S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogen. Carcin. Mut.**, v. 17, p. 85-95, 1997.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; LEITÃO, A.C.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureioides* in prokaryotic organisms. **Mutat. Res.**, v. 240, p. 13-18, 1990.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Med.**, v. 70, p. 551-555, 2004.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J.L.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; VAN PUYVELDE, L.; De KIMPE, N.; VAN STADEN, J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicol In vitro**, v. 8, p. 29-35, 2004.

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; De OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M.A.D. Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their typanocidal activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, p. 151-157, 2002.

VON BORSTEL, R.C.; CAIN, K.T.; STEINBERG, C.M. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. **Genetics**, v. 69, p. 17-27, 1971.

WEIL, M.; JACOBSON, M.D.; COLES, H.S.R.; DAVIES, T.J.; GARDNER, R.L.; RAFF, K.D.; RAFF, M.C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **J. Cell. Biol.**, v. 133, p. 1053-1059, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review.** Geneva, 1998.

\_\_\_\_\_. **WHO monographs on selected medicinal plants.** Geneva, 1999. v. 1.

WILLIS, J.C. **A dictionary of flowering plants and ferns.** 8<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge Press, 1973.

WOGAN, G.N., HECHT, S.S., FELTON, J.S., CONNEY, A.H., LOEB, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 14, p. 473-486, 2004.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CAVALCANTE FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTTI, L.; CAPPELLINE, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M.; PAPA, S. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. **Cytometry**, v. 44, p. 57-64, 2001.

ZHANG, H.Y.; YANG, D.P.; TANG, G.Y. Multipotent antioxidants: from screening to design. **Drug Discov. Today**, v. 11, p. 749-754, 2006.

ZHANG, Y.; LIU, J.; JIA, W.; ZHAO, A., LI, T. Distinct immunosuppressive effect by *Isodon* extracts. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 1957-1965, 2005.

ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 71-86, 1975.